INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

1 ABR. 1993

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
01 Nº.100.117 W		1992/02/11	

Requerente (71):
CAMBRIDGE NEUROSCIENCE, INC., norte-americana (Estado de Massachusetts) com sede em 1 Kendall Square Building 700, Cambridge MA 02139, EUA

Inventores (72):
Stanley M. Goldin, Kazumi Kobayashi, Andrew G. Knapp, Lee Margolin, Subbarao Katragadda, Deborah Daly, Lain-Yen Hu, N. Laxma Reddy - todos residentes nos EUA

Reivindicação de prioridade(s) (30)

Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido
1991/02/11	US	07/654.104

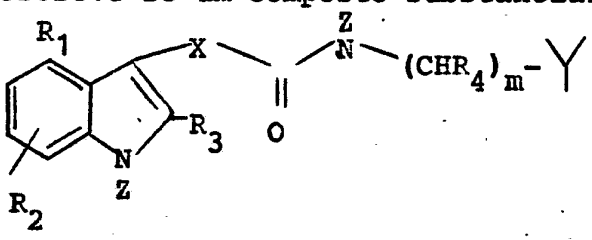
Figura (para interpretação do resumo)

Epígrafe: (54)
COMPOSTOS ANTAGONISTAS DOS CANAIS DO CÁLCIO NA CÉLULA VIVA, CONTENDO O GRUPO INDOL NA SUA FÓRMULA, OBTENÍVEIS A PARTIR DO VENENO DA ARANHA

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

Descreve-se um composto substancialmente puro da fórmula:

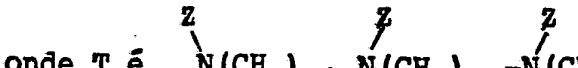


(I)

na qual

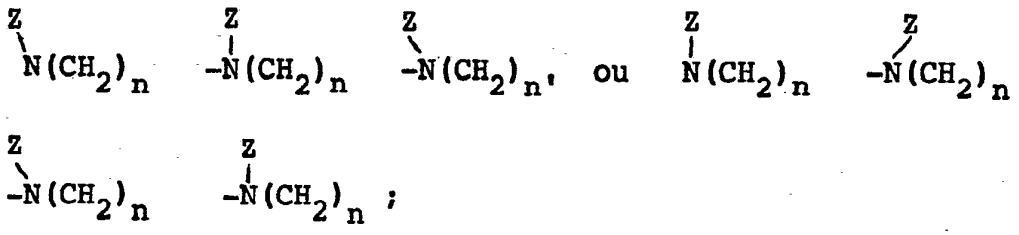
cada R_1 e R_2, é independentemente H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, OCH_3, OCF_3, benziloxi, SH, SCH_3, NH_2, N_3, NO_2, CN, COOH, $CONH_2$, CH_2CONH_2, ou SO_2NH_2; R_3 é H, CH_3, COOH, $CONH_2$, ou COOR onde R é alquilo C_{1-4}; cada R_4 é independentemente, H ou alquilo C_{1-6};

X é CH_2, CH_2CH_2, CH=CH, ou $CH_2CH_2CH_2$;

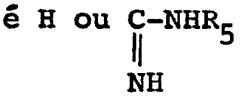
Y é  ou  onde T é ;

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
01 Nº.100.117 W		1992/02/11	

Resumo (continuação) (57)



cada Z é independentemente H, CH_3, ou Q onde Q é um acilo hidrofóbico, benzoilo, fenacetilo, benziloxicarbonilo, alcoxicarbonilo, ou N-metil-dihidropiridina-3-carbonilo, e está ligado a N por uma ligação amida que é clivável por um enzima do sistema nervoso central endógeno;

D é H ou  onde R_5 é H ou alquilo C_{1-4}

m é um número inteiro de 2 a 12, inclusivé; e

cada n é, independentemente, um número inteiro de 2 a 12, inclusivé;

uma composição terapêutica incluindo esse composto, e no processo para identificar os antagonistas de canal do cálcio.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

DSM-5 MOORE

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

-4-09-1992

"ANTAGONISTAS DE CANAL DE CÁLCIO E METODOLOGIA PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO"

Enquadramento Geral da Invenção

Esta invenção foi feita no decurso de trabalho parcialmente suportado pelo Governo dos EUA, o qual tem certos direitos nesta invenção. A invenção trata de antagonistas do canal de cálcio, da metodologia para a sua identificação, e das suas aplicações terapêuticas.

Os canais de cálcio são moléculas proteicas, contendo poros que se extendem através das membranas das células ou dos organelos celulares, os quais abrem e fecham reversivelmente, regulando assim a passagem de iões Ca++ para dentro e para fora da célula ou do organelo. O tipo de canais de cálcio denominado "sensível ao potencial eléctrico" abre e fecha em resposta a modificações na diferença de potencial de um lado para o outro da membrana celular. Existem pelo menos três sub-classes conhecidas de canais de cálcio sensíveis ao potencial eléctrico ("tipo-L", "tipo-N", e "tipo-T") as quais diferem nas suas propriedades farmacológicas, na localização nos tecidos neuronais e não neuronais, e nas propriedades fisiológicas [Nowycky, M.C. e outros (1985) Nature 316:440; Bean, B.P. e outros (1989) Ann. Rev. Physiol. 51:367].

Os canais do tipo-L são caracterizados por (1) "alto limiar" de activação, isto é, é necessária uma forte despolarização da membrana celular onde estão localizados para abrir tais canais; (2) grande "condutância por canal", isto é, cada canal, quando aberto, pode permitir a passagem de iões Ca^{2+} a uma taxa relativamente elevada; (3) maior permeabilidade ao Ba^{2+} do que ao Ca^{2+}; e, de particular nota, (4) pela sensibilidade ao bloqueio de alta

AGO 1992

potência pelos antagonistas dos canais de cálcio, da classe da dihidropiridina, tais como nimodipina e nifedipina (caracteristicamente os valores IC_{50} para bloqueio do canal-L por estas drogas situam-se abaixo de 1 μM). Na maioria dos casos, os "potenciais de acção" do cálcio mediados pelos canais tipo-L sob circunstâncias fisiológicas normais são de relativa longa duração, tipicamente não menos do que 100 msec.

Os canais do tipo-L do sistema cardiovascular são os locais de acção de várias classes de antagonistas do cálcio terapêuticamente importantes: as já antes mencionadas dihidropiridinas (sendo particularmente importante a nifedipina), as fenilalquilaminas (por exemplo, verapamil), e as benzodizepinas (por exemplo, diltiazem) [Schwartz, A. e outros (1988) Amer. J. Cardiol. 62,3G]. Estas drogas têm sido largamente empregues com sucesso no tratamento da hipertensão, da angina de peito, das arritmias cardíacas, e da insuficiência cardíaca congestiva [Katzung, W.B. (1987) Basic and Clinical Pharmacology, 3ª Edição, Lange Medical Books, Norwalk, CT, Caps. 10-13].

A nimodipina, antagonista do cálcio dihidropiridina, actua, como vasodilatador cerebral [Wong, M.C.W. and Haleym E.C.Jr. (1889) Stroke 24:31], e como bloqueador da entrada de cálcio dos neurónicos [Scriabine, A. (1990) Adv. in Neurosurg. 18:173; Nuglish, J. e outros (1990) J. Cereb. Blood Flow and Metab. 10:654]. Têm-se verificado melhorias modestas no êxito do tratamento de acidentes vasculares cerebrais (AVC) em ensaios clínicos com nimodipina [Gelmers, H.J. e outros (1988) N. Eng. J. Med. 318:203].

Embora haja efeitos cardiovasculares secundários significativos, a nimodipina pode desempenhar um papel no tratamento crónico do AVC e noutras desordens neurológicas. O bloqueamento dos canais tipo-L nos neurónicos cerebrais parece influenciar, pelo menos em parte, os

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

efeitos terapêuticos da nimodipina no AVC e noutras formas de isquémia, na epilapsia, e em, modelos animais de demência [Scriabine, A. (1990) ibid; Deyo, R.A. e outros (1989) Science 243.809]. A nimodipina é correntemente sujeita a ensaios clínicos para uso na terapia da doença de Alzheimer.

Os canais do tipo-T são caracterizados por terem um limiar de activação relativamente baixo, e por se inactivarem rapidamente quando activados por fortes despolarizações. Eles são relativamente insensíveis às dihidropiridinas. O seu baixo limiar de activação torna-os muito apropriados para participarem no estabelecimento do ritmo cardíaco, e consequentemente eles parecem desempenhar um papel primordial na regulação da frequência cardíaca.

Os canais do tipo-N são canais com um limiar elevado, sendo mais apropriadamente descritos como insensíveis à dihidropiridina, mas bloqueados pela interacção com a toxina cónica do caracol: conotoxina omega. Qualitativamente, como uma classe, os canais do tipo-N inactivam de alguma forma mais rapidamente do que os canais do tipo-L. Porque existe quanto a este assunto uma sobreposição entre as classes de canais tipo-N e L, as diferenças na cinética da inactivação não constituem uma característica definidora.

Recentemente, foi relatada uma outra classe de canais de cálcio [Sah, D.W.Y. e outros (1989) Soc. Neurosci. Abs. 15, 823; Regan e outros, Neuron 6, 264]. Esta classe, aqui denominada "canais do tipo-R", pode ser caracterizada como possuindo canais de cálcio com elevado limiar de activação, relativamente resistentes ao bloqueio por dihidropiridina e conotoxina omega. Tais canais encontram-se numa larga variedade de neurónios, e são particularmente abundantes nas células de Purkinje do cerebelo. Os canais do tipo-R podem desempenhar um papel na transmissão sináptica e noutros processos que dependam da entrada de

cálcio mas que não sejam sensíveis a estes bloqueadores.

O quadro 1, adoptado de Regan, L.J., e outros (1991), Neuron 6:269, mostra que a sensibilidade das correntes de cálcio de alto limiar, registada em várias células nervosas, varia com a nitrendipina e também com o péptido cónico do caracol antagonista do cálcio WCTX-GVIA. A proporção da corrente de cálcio "tipo-R" varia substancialmente: as correntes de cálcio de alto limiar das células dos gânglios cervicais superiores (GCS) mostram uma resistência mínima à combinação duma dihidropiridina (nifedipina) e WCTX.

Quadro 1. Inibição da Corrente do Canal de Ca^{+2} de Alto Limiar

	Percentagem da Corrente de Controlo Bloqueada		
	ω -CgTx (3 μM)	Nitrendipina (10 μM)	ω-CgTx + Nitrendipina
DRG	54 ± 2(44)	31 ± 2(24)	69 ± 2(36)
GCS	85 ± 2(15)	18 ± 2(15)	90 ± 1(15)
Medula espinal	52 ± 3(17)	30 ± 6(12)	67 ± 4(17)
Cortex visual	41 ± 5(15)	31 ± 7(12)	62 ± 5(15)
Hipocampo CA1	27 ± 2(18)	30 ± 3(17)	49 ± 3(18)
Cerebelo de Purkinje	7 ± 1(18)	8 ± 1(17)	8 ± 2(14)

Regan, Sah & Bean 1991

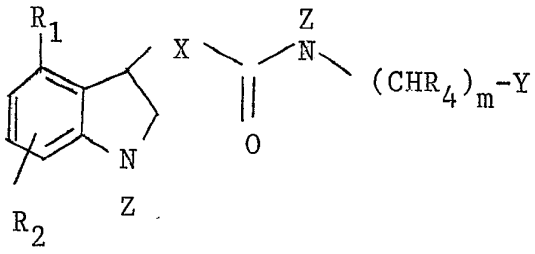
Em contraste, as células de Purkinje do cerebelo estão no extremo oposto. (Esta corrente de cálcio resistente da

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

célula de Purkinje também tem sido designada por corrente "tipo-P" [Llinas, R. e outros (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 86:1689]; em virtude da definição dos canais do tipo-P parecer ambígua e se poder sobrepor com as dos canais, quer do tipo-N, quer do tipo-R, o uso deste termo será evitado daqui para a frente.) Torna-se claro a partir do Quadro 1 que os antagonistas dos canais de cálcio tipo-L sujeitos a avaliação clínica como neuroprotectores (por exemplo: nimodipina e nicardipina) têm uma capacidade relativamente limitada para bloquear a entrada de cálcio através dos canais de cálcio, sensíveis à diferença de potencial, situados nos neurónios. Esta observação poderia, em parte, contribuir para a falta de clara eficácia das dihidropiridinas como a nimodipina nos ensaios clínicos efectuados até à data em acidente vascular cerebral (AVC) agudo ou traumatismo craniano [Trust Study Group (1990), Lancet 336:1205; Teasdale, G. e outros (1991)]. A descoberta também aponta as potenciais vantagens de um composto caracterizado por funcionar como um antagonista de "largo espectro", tanto dos canais tipo-R como tipo-L, o que é uma característica do DOCi aqui descrita e reivindicada, o qual é um composto não peptídico derivado de veneno de aranha.

RESUMO DA INVENÇÃO

Num aspecto a invenção proporciona compostos substancialmente puros da fórmula:



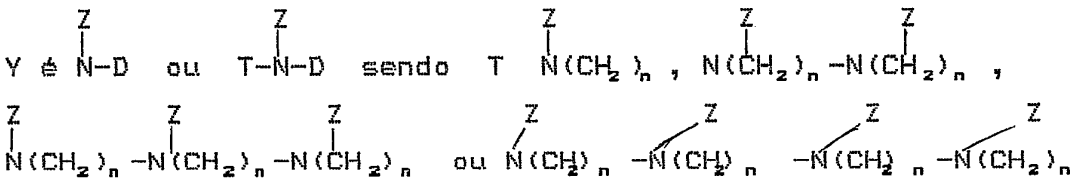
(I)

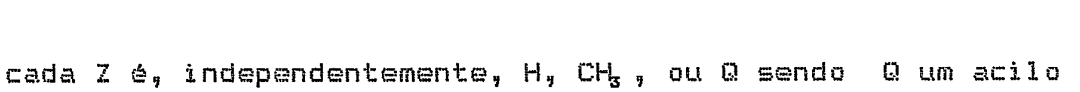
onde cada R_1 e R_2 é, independentemente, H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, OCH_3, OCF_3, óxido de benzilo ("OBz"), SH, SCH_3, NH_2, N_3, NO_2, CN, COOH, $CONH_2$, CH_2CONH_2, ou SO_2NH_2;

R_3 é H, CH_3, COOH, $CONH_2$, ou COOR sendo R um alquilo C_{1-4};

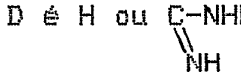
cada R_4 é, independentemente, H ou um alquilo C_{1-6};

X é CH_2, CH_2CH_2, CH=CH, ou $CH_2CH_2CH_2$;

Y é  sendo T



cada Z é, independentemente, H, CH_3, ou Q sendo Q um acilo hidrófobo, benzoílo, fenacetilo, benziloxicarbonilo, alcoxicarbonilo, ou N-metil-dihidropiridina-3-carbonilo, estando Q ligado a N (ao N que lhe é imediatamente adjacente) por uma ligação amido que é fraccionável por enzima endógeno do sistema nervoso central;

D é H ou  sendo R_5 H ou alquilo C_{1-4};

m é um inteiro de 2 a 12, inclusivè; e

cada n é, independentemente, um inteiro de 2 a 12, inclusivè; ou um sal dessa fórmula.

Um "composto substancialmente puro" ou uma "preparação substancialmente pura de um composto", tal como esses termos são aqui usados, significa que o composto reivindicado é disponibilizado como uma composição em que menos do que cinco por cento do peso (e potencialmente tão pouco como zero por cento) consiste noutras moléculas orgânicas com as quais o designado composto se encontra naturalmente associado. As formas salinas do composto da fórmula (I) incluem, mas não se limitam a acetato, trifluoraacetato ou hidrocloreto e sulfato.

Os termos acilo, benzoílo, fenacetilo, benziloxicarbonilo, e alcoxicarbonilo hidrófobos, na forma aqui usada, referem-se a porções daquelas classificações

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

que repelem a água. Por exemplo, as cadeias alquilo dos ácidos são hidrófobas conferindo a esses compostos a tendência para deixarem a fase aquosa e se associarem a outras estruturas hidrófobas como a fase lipídica das membranas celulares. Esta hidrofobicidade permite que tais compostos penetrem a barreira hidrofóbica hemato-encefálica, enquanto que um composto menos hidrófobo não a ultrapassaria. O termo "barreira hemato-encefálica" refere-se a uma fronteira entre a corrente sanguínea e o sistema nervoso central, e periférico compreendendo uma barreira à permeabilidade à difusão passiva de substâncias da corrente sanguínea para as várias regiões dos sistemas.

Preferivelmente cada R_1 e R_2 é, independentemente, H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, NH_2, NO_2, $CONH_2$; ou SO_2NH_2; R_3 é H, CH_3 ou $CONH_2$; R_4 é H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7 ou C_4H_9; X é CH_2, CH=CH, CH_2CH_2, ou $CH_2CH_2CH_2$; e Z é H ou CH_3.

Noutras realizações preferidas, R é OH, cada R_2, R_3, R_4, e Z é H, m é 3 ou 5,

Y é $-N(CH_2)_n-NH$; $-N(CH_2)_n-$; $-N(CH_2)_n-$; $-N-D$,

D é H ou $C-NH_2$, e

cada n é, independentemente, 3, 4, ou 5.

Alternativamente, m é 8, 10 ou 12; e

Y é $T-NH_2$ ou $T-NH-C(=NH)-NH_2$

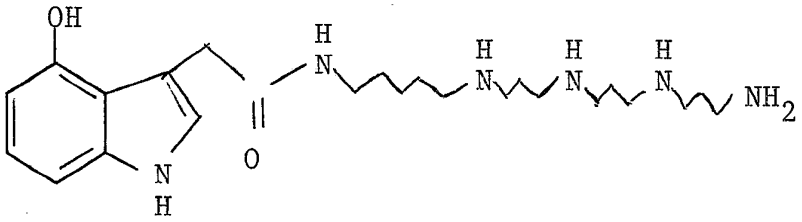
Também preferido é o composto da fórmula (I), sendo Q acilo ou benzoílo ligado a N por uma ligação amido; ou alternativamente, sendo Q fenacetilo, benziloxicarbonilo, ou alcoxicarbonilo ligado a N por uma ligação amido; ou alternativamente, sendo Q N-metil-dihidropiridina-3-carbonilo ligado a N por uma ligação amido. Em cada caso, Q é uma porção hidrofóbica que serve para mascarar a amina carregada, permitindo que o composto atravesse a

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

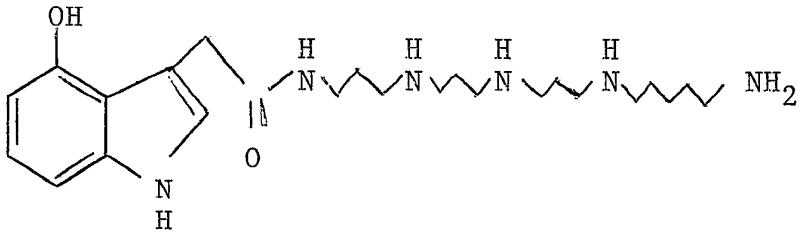
barreira hemato-encefálica. Depois do composto atravessar a barreira hemato-encefálica, a ligação amido pode ser fraccionada por enzimas endógenos no cérebro, libertando o composto activo.

Além disso, é preferível fornecer o composto da fórmula I, onde cada R_3 e R_4 é H; X é CH_2; Y é T-NH_2; m é 3, 4 ou 5, e cada n independentemente é 3, 4 ou 5. Os compostos mais preferidos são aqueles em que R_1 é OH, R_2 é H, e cada Z é H, e particularmente mais preferidos são aqueles em que m é 3 ou 5 e cada n é, independentemente, 3 ou 5.

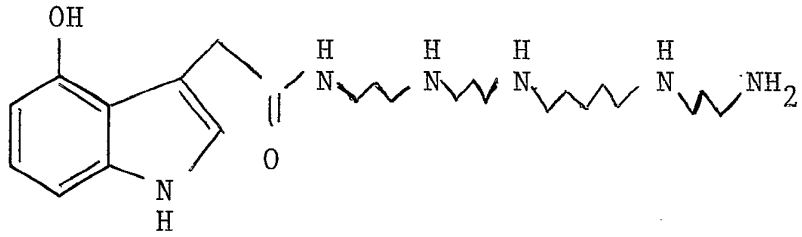
Os compostos preferidos têm as seguintes fórmulas:



(II)

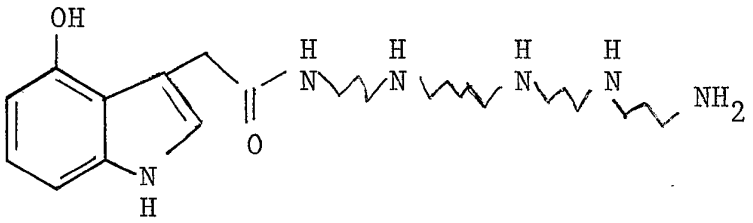


(III)

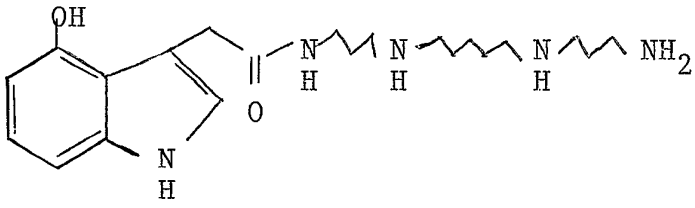


(IV)

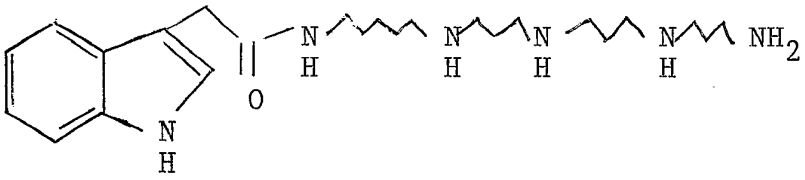
Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08



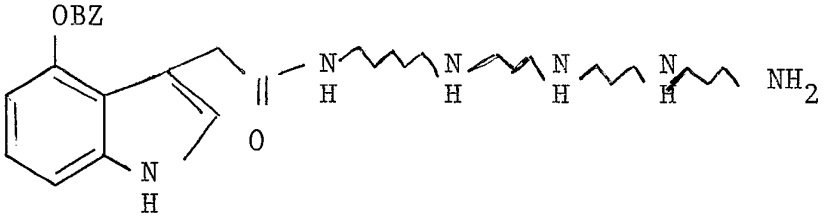
(V)



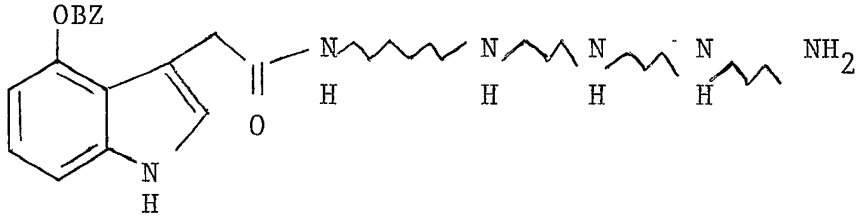
(VI)



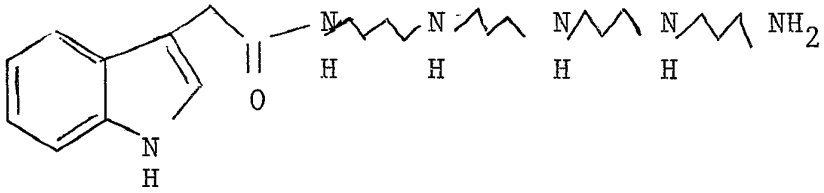
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

É preferível que o composto da fórmula I seja um amtagonista do canal de cálcio, isto é, que seja capaz de bloquear ou reduzir a extensão ou duração, ou ambas, da entrada de cálcio através dos canais de cálcio

sensíveis ao potencial eléctrico. O composto é mais preferivelmente um antagonista dos canais de cálcio do tipo-R, do tipo-L ou do tipo-T das cálulas neuronais dos mamíferos, (pertencendo essas células tanto ao sistema nervoso central como aos nervos periféricos), ou das células cardiovasculares dos mamíferos. Os canais de cálcio do tipo-R, tipo-L ou tipo-T foram definidos anteriormente no "Enquadramento da Invenção". O termo "células cardiovasculares" refere-se a todas as células que integram a função do sistema cardiovascular, salientando-se dada a sua importância:

(a) as células dos músculos lisos adjacentes às paredes dos vasos sanguíneos. A contracção destas células reduz o diâmetro dos vasos sanguíneos contribuindo, deste modo, para o aumento da pressão arterial. Os antagonistas dos canais de cálcio actuando nos canais tipo-L dessas células relaxam as células e dilatam os vasos sanguíneos contribuindo, deste modo, para a redução da pressão arterial.

(b) as células do músculo cardíaco responsáveis pela acção de bomba do coração.

(c) as células da rede de condução cardíaca (fibras de Purkinje e do tracto internodal) responsáveis pela condução dos impulsos eléctricos que despoletam a contracção do músculo cardíaco.

(c) as células dos nódulos SA e AV, que controlam, respectivamente, a frequência da batida cardíaca e o intervalo entre a contracção das aurículas e dos ventrículos.

Também é preferível que o composto da fórmula I seja um antagonista do canal de cálcio capaz de bloquear reversivelmente os canais de cálcio. Isto significa, que o antagonista funciona através de ligação não permanente (isto é, não covalente) às moléculas proteicas que constituem os referidos canais. Reversibilidade é indicada pelo desaparecimento do efeito de bloqueio quando o excesso da antagonista é removido das células através, por exemplo,

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

01. AGO. 1992

de lavagem das células ou do metabolismo gradual do composto.

Além do mais é ainda preferível que o composto da fórmula I seja um antagonista do canal de cálcio que bloqueia os canais de cálcio num grau mais elevado daquele em que bloqueia os canais activados por neurotransmissores, os canais de sódio sensíveis à diferença de potencial e os canais e potássio; isto é, o seu IC_{50} para os canais de cálcio é mais baixo (preferivelmente substancialmente mais baixo) do que para os tais canais activados por neurotransmissores, canais de sódio e canais de potássio.

Um outro aspecto da invenção envolve uma composição farmacêutica para o tratamento de um estado caracterizado por um afluxo excessivo ou insuficiente de cálcio para dentro das células. A composição inclui uma quantidade terapêuticacamente eficaz de um antagonista do canal de cálcio da fórmula I, num veículo aceitável em termos farmacêuticos. O termo "quantidade terapêuticamente eficaz" é definido abaixo.

Preferivelmente, a composição farmacêutica é para o tratamento dum estado que envolva um afluxo excessivo ou insuficiente de cálcio para dentro das células, incluindo tal, estados como acidente vascular cerebral (AVC), traumatismo craneo-encefálico, doença de Alzheimer. demência por multienfartes, outros tipos de demência, doença de Korsakoff, uma neuropatia causada por uma infecção viral do cerébro ou da medula espinal (por exemplo, o vírus HIV causador da SIDA), esclerose amiotrófica lateral, convulsões, crises epilépticas, doença de Huntington, amnésia, ou danos no sistema nervoso causados por redução do fornecimento de oxigénio, venenos ou outras substâncias tóxicas. é particularmente preferível que o composto seja capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica dum mamífero.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

A 90/1992

A composição farmacêutica da invenção pode também ser usada no tratamento dum estado caracterizado por um fluxo de cálcio excessivo ou insuficiente para dentro das células cardiovasculares, incluindo tal, estados como arritmia cardíaca, angina de peito, dano do sistema cardiovascular por hipóxia, dano do sistema cardiovascular por isquémia, enfarte do miocárdio, ou insuficiência cardíaca congestiva.

Está também inserida na invenção uma preparação substancialmente pura (tal como o termo foi definido antes) de um composto, o qual está presente numa aranha pertencente a uma das seguintes famílias: Pisauridae, Theraphosidae , Ctenizidae, Atypidae. Argyronetidae, Oxypodidae, Lycosidae, Gnaphosidae, Clubionidae, Ctenidae, Heteropodidae, Thomisidae, ou Salticidae (preferivelmente Pisauridae), e que funciona como um antagonista do canal de cálcio. Preferivelmente, o composto não é um polipéptido, sendo antes uma molécula como a poliamina, isto é, um composto contendo dois ou mais grupos amina, presente numa aranha do género Dolomedes (por exemplo, da espécie okefenokiensis) ou do género Phoneutria, os quais incluem aranhas com venenos particularmente potentes.

Também inserido na invenção está um processo para obter uma preparação com actividade de antagonista do canal de cálcio. Este processo inclui como etapas a selecção duma aranha que naturalmente não empregue teias para capturar as suas presas (por exemplo, uma aranha duma das famílias referidas acima), a recolha do veneno da aranha (por exemplo, através de métodos padronizados familiares aqueles que pertencem à arte), o fraccionamento do veneno, e a identificação duma fracção do veneno, que mostre ter actividade como bloqueadora dos canais de cálcio. O fraccionamento do veneno pode ser realizado por qualquer um dos métodos bioquímicos padrão, incluindo HPLC, filtração por gel, cromatografia de afinidade, e cromatografia de permuta

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

ASO.1692

iónica. A identificação das fracções biologicamente activas pode ser convenientemente efectuada através de um ensaio tal como os que são seguidamente descritos.

Um desses ensaios, denominado "ensaio de microrrastreio", é útil para identificar uma substância em geral (por exemplo, um constituinte de veneno de aranha) que afecte o transporte através da membrana de uma molécula ou dum ião como o Ca^{++} ou Na^{+}. Esse ensaio inclui os seguintes passos (não excedendo o volume final da reacção mais do que 50 microlitros, preferencialmente não mais do que 25 microlitros e mais preferencialmente 10 microlitros ou menos): providenciar uma preparação de células, organelos ou vesículas membranosas (preferivelmente pertencentes a um mamífero); adição à preparação dum dado montante de uma dada molécula ou dum ião, os quais são marcados para se tornarem identificáveis; e comparação (a) do nível de moléculas ou iões marcados tomados pelas células, organelos ou vesículas membranosas na presença da substância que está a ser testada, com (b) o nível tomado pelas células, organelos ou vesículas membranosas na ausência dessa substância. Entre os organelos úteis para o ensaio podem incluir-se o retículo endoplasmático, retículo sarcoplasmático, e estruturas neurosecretosas tais como sinaptosomas. O termo "vesículas membranosas" designa estruturas vedadas e semi-permeáveis ligadas por membranas celulares, que são artificialmente criadas através do processamento de células ou de material derivado de células, utilizando métodos bem conhecidos na arte. As vesículas membranosas são tipicamente produzidas por procedimentos que podem incluir sonicação, homogenização, choque osmótico, tratamento detergente suave, ou várias combinações dos mesmos.

Quando certas células frágeis são utilizadas nos procedimentos acima descritos, é preferível que elas se encontrem ligadas a um suporte sólido, por exemplo, a leitos microtransportadores tais como os Sigma Glass Micro-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

- 4 AGO 1992

carrier Beads ou os Cultusher-GTM Microporous Gelatin Microcarriers, ou a um suporte microporoso, por exemplo, um filtro microporoso como os filtros Millipore HA ou os filtros de fibra de vidro Whatman.

A invenção emgloba também um antagonista do canal de cálcio identificado por meio do processo da invenção descrito anteriormente, o qual inclui, embora não limitado a, um antagonista identificado a partir de veneno de aranha.

Os antagonistas do canal de cálcio da invenção são 'uteis no tratamento de estados neurológicos e cardiovasculares caracterizados por um afluxo excessivo de iões cálcio. Alguns destes antagonistas do canal de cálcio são eficazes no bloqueio dos canais de cálcio, quer do tipo-R, quer do topo-L, e por conseguinte têm um espectro de acção mais lato do que os fármacos conhecidos que actuam principalmente sobre um único tipo de canal. Além disso, os antagonistas do canal de cálcio da invenção que mostram especificidade maior pelos canais do tipo-R do que pelos do tipo-L podem ser eficazes no tratamento de desordens neurológicas, produzindo menores efeitos secundários cardiovasculares do que alguns antagonistas vulgarmente disponíveis que actuam básicamente nos canais do tipo-L. O uso do veneno de aranhas, que naturalmente não empreguem teias para capturar as suas presas, baseou-se na teoria que o seu veneno tem de actuar mais rapidamente devendo por isso ser uma fonte particularmente desejável de fármacos potentes. O sucesso do isolamento, a partir de um tal veneno, de antagonistas do canal de cálcio específicos e potentes demonstram a vantagem desta abordagem.

Com a descrição detalhada que se segue, e através das reivindicações, tornar-se-ão perceptíveis outras vantagens e características distintivas da invenção.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Descrição Detalhada

Em primeiro lugar descrever-se-ão as figuras.

Figuras

As figs. 1-5 são perfis elucidativos do veneno de Dolomedes okefenokiensis fraccionado por cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) de fase invertida, ilustrando a absorvância a 214 nm em relação ao tempo. A fig. 5 também ilustra a absorvância a 254 nm em relação ao tempo.

A fig. 6 é um gráfico que mostra que o DOC1 e o DOC3, dois compostos purificados a partir de veneno de aranha, bloqueiam a captação de cálcio, estimulada com potássio, pelas células pituitárias de clone GH_4C_1.

As figs. 7-9 são esquemas sintéticos para sintetizar DOC1, DOC3 e seus semelhantes.

A fig. 10 é gráfico que mostra que o DOC1 é capaz de bloquear reversivelmente a corrente eléctrica através dos canais de cálcio de células pituitárias de clone GH_4C_1.

As figs. 11A e 11B são gráficos que mostram que o DOC1 bloqueia a corrente de alto limiar que atravessa os canais de cálcio de células N1E-115 de neuroblastoma, na presença de nimodipina.

A fig. 11C é um gráfico que mostra que o DOC1 tem pouco efeito sobre a corrente do tipo-T das células N1E-115 evocada por fracas despolarizações dos potenciais de repouso negativos.

A fig. 12 é um gráfico que mostra que o DOC1 pode bloquear até 45% da corrente de alto limiar remanescente durante o tratamento com nimodipina das células N1E-115.

A fig. 13 é um gráfico que mostra que o bloqueio das correntes de cálcio depende da concentração de

DOC1 sintético.

A fig. 14 é um gráfico que mostra a corrente de bário nas células de neuroblastoma de murino N1E-115 tratadas com nomidipina. O painel esquerdo: os efeitos de 60 μM de DOC1 sobre correntes bário (tipo-R) de alto limiar resistentes às DHP. O painel direito: os efeitos de 60 μM de DOC1 sobre correntes (tipo-t) de bário de baixo limiar.

A fig. 15 é um perfil da actividade antagonista do canal de cálcio do tipo-L em fracções do veneno da aranha Dolomedes okofenokiensis separadas por HPLC.

A fig. 16 é um perfil da actividade antagonista do canal de cálcio sináptico em fracções do veneno da aranha Ctenus captious separadas por HPLC.

A fig. 17 é um perfil da actividade antagonista do canal de cálcio em fracções do veneno da aranha Sosippus californicus separadas por HPLC.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Purifficação de DOC1 e DOC3 a partir de Veneno de Aranha

As aranhas Dolomedes okefenokiensis foram recolhidas no Norte da Florida e o seu veneno foi extraído pela The Spider Farm (Arizona) através de estimulação eléctrica, a qual produziu uma preparação de veneno em bruto que foi fornecida aos inventores numa solução congelada. O veneno foi derretido em gelo, dividido em porções apropriadas, e mantido a -80ºC até ser utilizado.

Tanto o DOC1 como o DOC3 foram purificados através de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC), utilizando o sistema de HPLC Beckman System Gold. Como é descrito abaixo, foram seguidos dois protocolos. O primeiro originou a descoberta dos compostos denominados DOC1 e DOC3, e o segundo foi subsequentemente usado como rotina de procedimento para a preparação dos compostos em grande escala.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

(1) Purificação Inicial para Selecção

(a) Identificação da fracção de DOC:

O veneno em bruto congelado (40 µl) foi derretido em gelo e misturado com 210 µl de gelo-frio de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% em H_2O. A solução foi centrifugada à temperatura ambiente durante 5 min. a 13 000 rpm com uma centrifugadora Eppendorf, e 240 µl do sobrenadante foi aplicado a uma coluna de HPLC C18 de fase-invertida (100 x 250 mm, 5 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro, coluna NGA pré-guarnecida pelo Grupo NEST). A HPLC foi executada utilizando um gradiente de acetonitrila de 0 a 30% em TFA a 0,1% durante 105 min. a uma velocidade de fluxo de 4,0 ml/min. A eluição foi monitorada por absorvência a 214 nm e 254 nm, e as fracções foram recolhidas manualmente de acordo com o perfil da eluição. Secaram-se as amostras, representando 5% de cada fracção (correspondentes a 2 µl de veneno em bruto por amostra), com um Speed Vac (Savant), suspenderam-se num tampão, e testou-se a sua capacidade para bloquear o afluxo de $^{45}Ca^{2+}$ para dentro das células de rato GH4C1 (ver "O Ensaio de Microrrastreio para Bloqueadores do Canal de Cálcio do Tipo-L" adiante). A terceira maior fracção, eluida numa concentração de acetonitrila de cerca de 7% (ver Fig.1) inibiu o afluxo numa percentagem superior a 80%; ela foi designada a fracção "DOC".

(b) Fraccionamento subsequente da fracção DOC:

Misturaram-se 80 µl de veneno em bruto com 160 µl de TFA a 0,1%, e a seguir fraccionaram-se através de HPLC como foi descrito anteriormente. A fracção que eluidiu na posição DOC (ver Fig. 2) foi dividida em porções iguais, seca com um Speed Vac (Savant), e a seguir dissolvida em TFA a 0,1% (equivalente a 64 µl de veneno em bruto em 200 µl de TFA a 0,1%) para posteriores procedimentos de purificação. Uma porção de 50 ul foi aplicada a uma coluna C18 de HPLC de fase invertida (100 x 250 mm, 5 µm de medida de

leito, 100 Å de medida de poro) equilibrada com metanol a 9% em TFA a 0,1%. A eluição foi realizada a uma velocidade de fluxo 2 ml/min, sob condições isocráticas em metanol a 9%-TFA a 0,1%, e monitorizada por absorvência 214 nm e 254 nm. As fracções de pico foram colhidas manualmente e secas com um Speed Vac. O procedimento de purificação foi repetido para o processamento de todas as fracções DOC (ver fig. 3).

Descobriu-se que o primeiro maior pico, DOC1, e o segundo maior pico, DOC3, são cromatograficamente bastante puros, e que são activos no ensaio de afluxo de $^{45}Ca^{2+}$. Estas preparações foram utilizadas como padrões de comparação com preparações de DOC1 e DOC3 subsequentes.

(c) Preparação subsequente de DOC1 e DOC3 para análise estrutural preliminar:

o DOC1 e o DOC3 foram preparadas conforme a descrição anterior, com a excepção de terem sido usadas duas colunas C18 semi-prepratórias ligadas em série (100 x 250 mm, 10 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro, coluna NGA pré-guarnecida pelo Grupo NEST) no segundo passo do fraccionamento, a uma velocidade de fluxo de 2 ml/min com acetonitrila a 12% em TFA a 0,1%. Foi obtida uma eluição padrão que é, essencialmente, igual à obtida com o sistema de solvente metanol em TFA a 0,1% usado anteriormente. As fracções correspondentes a DOC1, o primeiro maior pico, e DOC3, o segundo maior pico, foram secas com um Speed Vac e submetidos a uma caracterização estrutural preliminar após a pureza ter sido confirmada por HPLC. Todos os outros métodos foram idênticos aos descritos anteriormente.

As identidades destes supostos compostos DOC1 e DOC3 foram confirmadas por co-injecção com os padrões de DOC1 e DOC3, respectivamente, usando uma coluna C18 de HPLC analítica. Em alguns casos, a actividade das fracções purificadas foi reconfirmada.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

ACC/1992

(2) Protocolo da Rotina de Purificação em Grande Escala

Foi derretido em gelo veneno em bruto congelado (300-400 µl) e misturado com 100 µl de TFA a 0,1%. A solução foi centrifugada num ambiente frio durante 5 min. a 13 000 rpm com um Beckam Microfuge. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de HPLC C18 de fase invertida (200 x 250 mm, 10 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro, coluna NGA pré-guarnecida pelo Grupo NEST), e a HPLC foi executada utilizando um gradiente de acetonitrila de 0 a 35% em TFA a 0,1%, a uma velocidade de fluxo de 16 ml/min. durante 105 min. A eluição foi monitorizada por absorvência a 214 nm, e as fracções foram recolhidas manualmente de acordo com o perfil da eluição. Como é mostrado na fig 4, o terceiro maior pico que foi eluido com acetonitrila a uma cencentração de cerca de 10% foi designado fracção DOC e foi seco durante a noite com Speed Vac. A fracção seca foi dissolvida em 200 µl de TFA a 0,1% e aplicada a uma coluna de HPLC ODS-AQ (200 x 250 mm, 10 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro, coluna YMC pré-guarnecida pela YMC, Inc.) equilibrada com acetonitrila a 10% em TFA a 0,1%. A eluição foi executada com o mesmo tampão a uma velocidade de fluxo de 8 ml/min, e monitorizada por absorvência a 214 nm (fig. 5) e 254 nm. O primeiro maior pico, que elui a cerca de 46-50 min da eluição isocrática, foi recolhido em várias fracções como DOC3 . O segundo maior pico, que elui a cerca de 50-58 min, foi recolhido em várias fracções como DOC1. (A ordem da eluição de DOC1 e DOC3 é invertida quando a coluna ODS-AW é substituída pela coluna ODS-AQ). Foi examinada a pureza de cada fracção por HPLC analítica utilizando uma coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro). Foi usada uma eluição isocrática com acetonitrila a 9% em TFA a 0,1%, seguida por um gradiente de acetonitrila de 10 a 20% em 5 min. a uma velocidade de fluxo de 1 ml/min. As fracções puras (de

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

pureza maior do que 95%) foram combinadas como DOC1 ou como DOC3, enquanto que as fracções com pequenas quantidades de contaminação (geralmente menos do que 20%) foram combinadas e posteriormente repurificadas com o mesmo método.

A identidade do DOC3 assim preparado foi confirmada pela co-injecção duma porção da amostra deste suposto DOC3 e do DOC3 padrão numa coluna de HPLC analítica C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm de medida de leito, 100 Å de medida de poro). Foi usada eluição isocrática com acetonitrila a 9% em TFA a 0,1%, seguida por um aumento da concentração de acetonitrila para 20% em 5 min a uma velocidade de fluxo de 1 ml/min. Foram também usados para confirmar a identidade de preparação o espectro de absorção (190-390 nm) obtido com um detector de sistema de diodo e o espectro NMR obtido com um equipamento de 300 MHz. Tipicamente, obtiveram-se a partir de 400 µl de veneno em bruto cerca de 0,4 mg-1 mg, tanto de DOC1 como de DOC3.

Ensaio de Microrrastreio para Bloqueadores do Canal de Cálcio do Tipo-L

A fracção DOC e as fracções DOC1 e DOC3, purificadas posteriormente a partir da primeira, mostraram possuir actividade bloqueadora do cálcio através do seguinte método de rastreio.

(1) SOLUÇÕES

Todos os tampões foram construídos em água desionizada e destilada (H_2Odd). Todos os vidros foram lavados utilizando um procedimento igual ao anterior.

(a) Solução de Sal Equilibrada de Hanks (Hanks)

Comprada ao Flow Laboratories (Cat. No. 18-104-49). Estava isenta de cálcio e magnésio e incluía um indicador vermelho de fenol.

(b) 0,02% de EDTA Hanks

Preparado adicionando 20 mg de dissódio EDTA

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

a 100 ml de Hanks.

(c) CMT-Hanks

Preparado a partir de Hanks e contendo 16,6 mM de $CaCl_2$. 16,3 mM de $MgCl_2$ e 6,6 mM de tris base. O tris base é necessário para neutralizar a mudança de pH devida à presença de cálcio.

(d) Sais Básicos Tamponados de Hepes (HBBS)

Contém 10 mM de glicose, 5 mM de cloreto de potássio, 130 mM de cloreto de sódio, 0,5 mM de cloreto de cálcio, 1 mM de cloreto de magnésio, e 10 mM de hepes; e o pH foi ajustado a 7,2 com trisbase a 40%.

(e) HBBS de Potássio Alto (KHBBS)

é o mesmo que o HBBS excepto que 135 mM de cloreto de potássio são substituídos pelas concentrações de sódio e potássio expressas acima.

(2) STOCKS DE ISOTÓPOS DE CÁLCIO

Para preparar stock de K^+ alto e stock de K^+ baixo foi usada uma solução de stock de ^{45}Ca de New England Nuclear, 24 Ci/g Ca, 50 mCi/ml, da seguinte forma.

(a) O stock de K^+ alto foi preparado adicionando 10 µl de stock de ^{45}Ca da NEN a 1 ml de HBBS.

(b) O stock de K^+ baixo foi preparado adicionando 10 µl de stock de ^{45}Ca da NEN a 1 ml de HBBS.

Como pode ocorrer um erro substancial na pipetação destes pequenos volumes, foram contados 2 x 2 µl de cada em 10 ml de fluído de cintilação líquido tendo sido as contagens então corrigidas através da adição de mais volume no caso da existência de um erro superior a 5% nas contagens totais.

(3) PREPARAÇÃO DE CÉLULAS

As células pituitárias de rato GH_4C_1, uma

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

1 AGO 1992

linha celular largamente disponível obtida através do Dr. Armen Tashjian, da Harvad Medical School, foram usadas para medir o efeito das preparações DOC sobre o afluxo de cálcio para dentro das células. é bem conhecido que esta linha celular tem canais de cálcio tipo-L (sensíveis à dihidropiridina) [Tan, K. e outros (1984) J. Biol, Chem. 259-418].

As existências de células mantiveram-se congeladas em nitrogénio líquido até à sua utilização. Uma ampola foi descongelada e depois semeada num frasco de cultura T-75 e aumentada até à confluência. De seguida, as células foram tratadas com uma solução de tripsina a 1% em Hanks e recolocadas nos frascos de cultura T-25 em diluições diferentes. As existências foram então mantidas em crescimento e separadas conforme as necessidades em vez de recongeladas. O meio usado foi o F-10 de Ham fornecido pela Media-Tech contendo soro fetal de vitelo a 10% inactivado pelo calor, aquirido na Hyclone. Em geral, a melhor resposta foi obtida de células com 3-5 dias de pós-confluência.

A suspensão celular de um dos frascos T-25 foi preparada para experiências como se segue. O frasco foi lavado suavemente 2x com Hanks. Foram adicionados a um frasco 10 ul Hanks-EDTA quente a 0,02% e deixados estar durante aproximadamente 30 segundos. O prato foi abanado, invertido e sacudido sobre uma superfície dura para desalojar as células. Foram imediatamente adicionados e abanados 0,6 ml de CMT-Hanks. As células foram então transferidas para um tubo centrífugo de 15 ml e centrifugadas durante 20-30 segundos a 50 g (700 RPM).

Com uma pipeta, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e ressuspendido por trituração da bola em 0,4 ml de HBBS. As células foram então transferidas para um frasco de vidro de fundo plano de 4 ml com uma pulga magnética e agitada à velocidade mais baixa.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

PCT/GB92/01592

(4) PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Uma preparação de veneno seco, por exemplo, DOC1 ou DOC3, foi suspendida em 7 µl HBBS e 1 µl foi então adicionado a 3,2 µl de suspensão de células num tubo de microcentrifugação de 1 ml e pré-incubada durante 5 min. De seguida, foram adicionados ao tubo 4,2 µl de stock de ^{45}Ca de K^+ baixo ou K^+ alto [eq. a 2 uCi/4,2 µl de células] e continuou incubação durante 1 min. Foram adicionados 790 µl de HBBS para extinguir a captação de cálcio nas células. A mistura foi então pipetada para cima e para baixo 2x antes de ter sido sujeita a filtração num filtro Amicon múltiplo com um filtro de fibra de vidro Whatman. O filtro foi lavado 5x com 5 ml de HBBS tampão de cada vez. É importante que o tampão seja seringado no lado da chaminé, seguindo logo para baixo, e não directamente para o filtro, pois isso pode ajudar a lavar as células, retirando-as do filtro e direccionando-as para cima da chaminé. Também é importante não causar um efeito de remoinho com a lavagem para o filtro ficar uniformemente limpo.

Foi usada uma chaminé separada para cada depósito e cada chaminé foi lavada após a utilização. O filtro também foi lavado uma vez, um pouco antes das células serem transferidas para cima dele, de forma a que estivesse húmido e o seu contacto não causasse a ruptura das células.

Cerca de 1 min. após a lavagem, a chaminé foi removida para libertar o filtro da sucção e minimizar o fracasso das contagens devido à ruptura de células. Um conjunto de quatro brancos (isto é, medições utilizando as mesmas soluções mas sem células) foi executado no fim do ensaio para se determinarem as contagens basais.

O filtro foi então agitado e dissolvido em 10 ml de fluído de cintilação líquido (hidroflúor) e contado durante 5 min. utilizando um contador de cintilação

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

beta. A captação de cálcio induzida por K+, isto é, despolarização, foi determinada a partir das amostras de K+ alto depois de subtraída a média das contagens de brancos e as correspondentes contagens de K+ baixo. Note-se que, as células foram despolarizadas por uma elevada concentração de K+ de forma a abrir os canais de cálcio activados pela diferença de potencial.

A percentagem da captação de cálcio bloqueada por uma dada preparação de veneno, foi calculada com base nos níveis da entrada de Ca^{2+} induzida por K+ na presença e na ausência da preparação.

A concentração celular também foi determinada usando um hemocitómetro para que pudesse ser calculada a quantidade capatada/mg de proteína.

(5) RESULTADOS

A Fig. 6 mostra as actividades de bloqueio do DOC1 e DOC3, respectivamente, neste ensaio. O DOC1 é várias vezes mais potente que o DOC3. Como será mostrado de seguida, a actividade de bloqueio do DOC1 foi confirmada por experiências electrofisiológicas. Note-se que 1 unidade de DOC1 ou DOC3 é definida a absorvência de 1 O.D. a 214 nm em 1 ml de solução aquosa.

<u>Explicação Estrutural do DOC1 e DOC3</u>

Tanto o espectro UV do DOC1, como do DOC3, mostram um padrão característico de um 4-hidroxiindol. Além disso, tanto o DOC1 como o DOC3 têm quatro sinais protão no seu espectro ^{1}H-NMR entre 6,4 e 7,1 ppm, o que é consistente com um 4-hidroxiindol com substituição na posição 3. A única (2H) em 3,65 ppm indica que existe uma unidade de ácido acético na posição 3 (em vez dum lactato). Por isso, tanto o DOC1 como o DOC3 contêm unidades de ácido 4-hidro-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

1 AGO 1992

xiindol-3-acético.

A espectroscopia de correlação filtrada de quanta duplo (DQ-COSY) bidimensional do DOC3 mostra a presença duma unidade metileno cinco (NCH_2 CH_2CH_2 CH_2CH_2 N) e de unidades metileno três (NCH_2 CH_2 CH_2 N).

A diferença entre o ^{1}H-NMR do DOC1 e de DOC3 parece ser a presença de três sinais metileno adicionais no DOC1. Dois destes sinais são a 2,8-3,1 ppm, o que significa que eles são adjacentes ao azoto. O outro sinal metileno é cerca de 1,8ppm o que é apropriado para o metileno central numa unidade de metileno três.

A espectrometria de massa de bombardeamento atómico rápido (FAB) do DOC1 revela um peso molecular de 446. Por esta razão. o DOC1 contém um ácido 4-hidroxiindol-3-acético, uma unidade 5-metileno e três unidades 3-metileno.

A estrutura atribuída ao DOC1 foi mostrada anteriormente na fórmula II. Crê-se que o DOC3 tenha uma estrutura similar ao DOC1, embora pareça ter uma cadeia poliamina mais curta.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

<u>Métodos Sintéticos para Produção de DOC1, DOC3 e Compostos Análogos</u>

A síntese do DOC1, DOC3 e compostos análogos pode ser mais fácilmente excutada em três passos, nomeadamente, síntese de uma unidade poliamina contendo os substituintes desejados, síntese de uma unidade de ácido 3-indol-acético adequadamente substituída, e condensação das unidades poliamina e indol. Esta estratégia tem sido utilizada para a síntese de compostos contendo poliamina de vários tipos. [Bruce, M. e outros (1990) Toxicon 28:1333].

(1) Síntese da Poliamina:

Nos últimos foi desenvolvida uma extensa metodologia para sintetizar poliaminas. [Saccomano, N.A. e

AGO. 1992

outros (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:287; Ganem, B. (1982) Acc. Chem. Res. 15:290; and Carboni, B. (1988) Tetrahedron Lett. 29:1279]. Já que, muitos tipos de diaminoalcanos (por exemplo, de cadeia C2-C12) estão comercialmente disponíveis, por exemplo, ver Aldrich Chemical Catalog 1990/1991, e são bem conhecidos na literatura os métodos para juntar diferentes unidades diamina, é possível sintetizar poliaminas contendo virtualmente qualquer combinação de unidades alcano. Num exemplo típico de síntese de 3,3,4-poliamina, a síntese começa a partir de 1,4-diaminobutano como está representado no Esquema I da Fig. 7 [Nakanishi, K. e outros (1990) Pure & Appl. Chem. 62:1223], e usa as seguintes reacções orgânicas padrão:

(a) Adição Michael de amina e acrilonitrila. Esta reacção foi originalmente desenvolvida por Shih, T. L. e outros (1987) Tetrahedron Lett. 28:6015, e mais tarde usada por Jasys, V. J. e outros (1990) J. Am. Chem. Soc. 112:6696 para síntese de várias unidades de poliamina.

(b) Reacção de protecção-boc, um passo de excelente produção. A reacção boc é geralmente usada para proteger o azoto, particularmente na química de péptidos sintéticos.

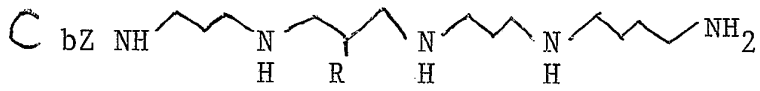
(c) A redução da nitrila a uma amina foi efectuada usando um dos seguintes reagentes, dependendo do tipo de grupos protectores utilizados na síntese da poliamina:

(i) $LiAlH_4$, [Nakanishi, K. e outros (1990) Pure & Appl. Chem. 62:1223]; (ii) catalisador de Pearlman $Pd(OH)_2$, HOAc, [Jasys, V. J. e outros (1990) J. Am. Chem. Soc. 112:6696]; (iii) Ni de Raney, [Shih, T.L. e outros (1987) Tetrahedron Lett. 28:6015]. As produções das reacções acima são bastante boas, permitindo a síntese de grandes quantidades de poliaminas em condições convenientes.

Utilizando a estratégia de síntese anterior (Esquema I, Fig. 7), também é possível sintetizar unidades substituídas de poliamina:

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

A30 1582



(XI)

R = CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , etc.

Esta síntese usa um diaminoalcano substituído (R = alquilo) como material de partida. A reacção de diamina com acrilonitrila seguida das reacções orgânicas padrão descritas no Esquema I (Fig 7) deve produzir a poliamina requerida. Para síntese da cadeia linear da unidade α,ω-diaminoalcano, estão disponíveis comercialmente diaminas contendo unidades de carbono até C_{12}. Ver, por exemplo, o Aldrich Chemical Catolog 1990/1991.

O grupo terminal amino da unidade de poliamina pode ser reposto com uma guanidina ou com uma porção de guanidina substituída em N. Uma vez que a desejada unidade de poliamina tenha sido preparada através da utilização do método no Esquema I (Fig. 7), o grupo amino livre na unidade pode reagir com uma cianamida substituída em N para dar a desejada guanidina. A reacção da amina com a cianamida substituída para produção de guanidina é um método bastante preconizado. [Scherz, M. W. e outros (1990), J. Med. Chem. 33:2421].

(2) Síntese do Ácido Indol-3-Alifático Substituído:

O procedimento geral para a preparação de ácidos indol-3-acéticos mono-, di-, e tri-substituídos começando a partir dos correspondentes indóis está repre-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

sentado no Esquema II (Fig. 8). Podem ser usados como materiais de partida na síntese dos ácidos indol-3-acéticos (Esquema II, Fig. 8), quer directamente quer com pequenas modificações, os indóis mono-substituídos ou di-substitutídos comercialmente disponíveis (por exemplo, 4-metoxiindol, 5-metoxiindol, 5,6-dimetoxiindol, 5-benziloxiindol, 4-hidroxiindol, 5-hidroxiindol, 5-bromoindol, 5-bromo-7-nitroindol, 4-cloroindol, 5-cloroindol, 6-cloroindol, 5-cloro-2-metilindol, 5-flúorindol, 5-aminoindol, 4-nitroindol, 5-nitroindol, ácido indol-4-carboxílico, ácido indol-5-carboxílico, 2,5-dimetilindol, 1-metilindol, 3-metilindol, 4-metilindol, 5-metilindol e 6-metilindol). Os indóis substituídos acima mencionados estão disponíveis, por exemplo, na Aldrich Chemical Co.

Nos casos em que o grupo funcional existente fosse sensível às condições da reacção, ele seria primeiro protegido. O indol substituído (composto 1 no Esquema II Fig. 8) é convertido primeiro para gramina-substituída (composto 2 no Esquema II, Fig. 8) por uma reacção viril seguindo os procedimentos de Stoll, A. e outros (1955) Helv. Chem. Acta 38:1452 e Poon, G. e outros (1986), J. of Labelled Compound and Radiopharmaceuticals 23:167. A porção dimetilamina no composto 2 é então deslocada pelo cianeto para formar indol-3-acetonitrila-substituída (composto 3 no Esquema II, Fig. 8) através do refluxo com cianeto de potássio em etanol/água. [Poon, G. e outros (1986), J. of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 23:167]. Finalmente, o desejádo ácido indol-3-acético substituído (composto 4 no Esquema II, Fig. 8) é obtido pela hidrólise do ácido ou hidrólise da base do composto 3 [Poon, G. e outros (1986), J. of Labelled Compounds and radiopharmaceuticals 23:167].

Os procedimentos descritos acima não são essenciais nos seguintes casos: 3-acetilindol, ácido 3-indolacrílico, ácido 3-indolpropiónico, ácido 3-indolbutí-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

30/1992

rico, ácido 2-metil-3-indolacético, desde que , estes compostos estejam comercialmente disponíveis. Eles podem ser aplicados no passo de ligação (Esquema III, Fig. 9) uma vez que as unidades indol requeridas, isto é, composto 5 no Esquema III, estejam disponíveis.

(3) Condensação da Poliamina com a Unidade Indol:

A ligação do indol substituído (composto 5 no Esquema III, Fig. 9) com uma poliamina protegida Cbz ou t-Boc é realizada na presença de diciclohexilcarbodiimida/N-hidroxisuccinimida como é descrito por Jasys, V. J. e outros (1990) J. Am. Chem. Soc. 112:6696, ou utilizando o éster activado p-nitrofenol do composto 5 e poliamina como é descrito por Nakanishi, K. e outros (1990) Pure & Appl. Chem. 62:1223. (Esquema III, Fig. 9). Finalmente, a desprotecção dará o DOC1 ou um composto análogo [Nakanishi, K. e outros (1990) Pure & Appl. Chem. 62:1223]. (Esquema III, Fig. 9).

O acetil benzoílo, fenacetilo, benzilocarbonilo e vários alcoxicarbonilos derivados de DOC1 ou seus semelhantes podem ser preparados para aumentar a liposílica do composto, e desse modo a sua capacidade para atravessar a barreira hemate-encefálica [ver, por exemplo, "Design of Prodrugs", publicado por Elsevier (1985) e editado por Bundgaard, pp. 27-35]. Estes derivados actuam como prodrogas, e os métodos para preparar estas prodrogas estão bem documentados na literatura [Dittert, L.W. e outros (1968) J. Pharm. Sci. 57:828; Inoue, M. e outros (1979), J. Pharm. Dyn. 2:229; e Dittert, L.W. e outros (1968) J. Pharm Sci. 57:774].

(4) Preparação de Derivados do DOC1, DOC3 e seus Semelhantes:

Acetatos: O método geralmente usado para a preparação destes derivados duma amina primária ou secundária é o tratamento da amina com anidrido acético como é descrito no

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

compêndio "Practical Organic Chemistry" de Vogel, Quarta Edição, pp. 1128.

Benzoatos e Fenacetatos: melhor forma de produção destes derivados duna amina primária ou secundária é através do tratamento da amina com o correspondente cloreto de benzoílo ou cloreto de fenacetilo como é descrito na reacção Schotten-Baumann, no compêndio "Practical Organic Chemistry" de Vogel, Quarta Edição. pp 682.

Carbamatos: A melhor forma de realizar a síntese de carbamatos de uma amina primária ou secundária é através do tratamento da amina com CO, O_2, e R-OH na presença de Pt e ião iodeto de acordo com Fukuoka e outros (1984) J. Org. Chem., 49:1458. Este método pode produzir derivados de alcoxicarbonilo ou de benziloxicarbonilo, dependendo do tipo de álcool usado na reacção. Especificamente, os álcoois alifáticos dão derivados alcoxicarbonilo, enquanto os álcoois aromáticos produzem derivados do tipo ariloxicarbonilo.

Ensaio de Microrastreio para Bloqueadores dos Canais de Cálcio dos Sinaptossomas

O método de rastreio usado para testar a actividade das preparações de veneno no bloqueio do cálcio das células GH_4 C_1, tal como foi anteriormente descrito, foi modificado da forma que se segue para determinar o efeito do DOC1 sobre a captação de cálcio nos sinaptossomas.

(1) TAMPÕES (em mM)

	Baixo K	Baixo K+Ca	Alto K+Ca	Interrupção
HEPES	10	10	10	10
D-Glucose	10	10	10	10
KCl	3	3	150	3
NaCl	147	147	0	147
$MgCl_2$	1.2	1.2	1.2	1.2
$CaCl_2$	0	3.3	3.3	0
Tris-EGTA	0	0	0	10

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Depois dos tampões terem sido produzidos, a osmolaridade do tampão de interupção foi ajustada por diluição com H_2Odd para um valor aproximadamente igual à média das osmolaridades dos outros três tampões. Todos os tampões foram únicamente ajustados com H_2Odd.

(2) STOCKS DE CÁLCIO 45

Para captação no estado básico: 5 µl de stoock NEN + 995 µl de tampão K baixo+Ca.

Para captação na despolarização (isto é, K^+ alto): 5 µl NEN + 995 µl de tampão K alto+Ca.

(3) PREPARAÇÃO DE SINAPTOSSOMAS

A preparação de sinaptossomas descrita abaixo foi adoptada dum procedimento publicado. [Hajos F., Brain Res. 93:485-489 (1975)].

O tampão básico utilizado, pH 7,4, tinha a seguinte composição: NaCl 147 mM, KCl 3 mM, HEPES 10 mM, Dextrose 10 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, e EGTA-Tris 1mM. O tampão K-alto era o mesmo que o tampão básico exceptuando as concentrações de NaCl e KCl que eram, respectivamente 95 mM e 55 mM.

Os sinaptossomas foram preparadas a partir de ratos masculinos CD com 4 a 6 semanas (50-75g). Os ratos foram mortos por decapitação com guilhotina, e o crânio foi aberto no centro com a lâmina ponteaguda da tesoura de dissecação. O osso foi então cortado com um corta ossos e o cérebro levantado com uma microespátula. Seguidamente, o cerebelo foi removido e o resto do cérebro colocado em 35 ml de uma solução de sucrose 0,32 M e homogeneizado num homogeneizador C de teflon de copo Thomas colocado na potência máxima (cerca de 450 rpm) com 16 pancadas. O pilão foi lavado com 5 ml de solução de sucrose e o material da lavagem adicionado ao produto homogeneizado.

Este foi então centrifugado durante 10 min. a 3500 rpm (1500 g) num rotor SS-34 numa centrifugadora

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

- 1 AGO. 1992

Sorvall RC-5B. A bola resultante (P_1) foi descartada e o sobrenadante (S_1) foi recentrifugado durante 20 min. a 8700 rpm (8500 g). O sobrenadante resultante (S_2) foi descartado e a bola (P_2) ressuspendida em 5 ml de sucrose de 0,32 M e homogeneizada manualmente com 4 pancadas num homogeneizador Thomas C. O volume foi elevado para 8 ml com uma de solução de sucrose de 0,32 M.

Este homogeneizado foi deitado em 20 ml de solução de sucrose de 0,8 M em dois tubos de centrifugação e centrifugado durante 25 min. a 8700 rpm (8500 g). No fim da centrifugação, a maioria da mielina tinha ficado na interfase de sucrose 0,32 M e 0,8 M, as mitocôndrias formaram uma bola castanha no fundo do tubo, e os sinaptossomas estavam dispersos em sucrose 0,8 M. Foi usada uma pipeta de 10 ml para recolher a camada de sucrose 0,8 M sem perturbar a mielina no topo da camada ou a bola. A solução recolhida foi lentamente diluída com igual volume de tampão básico arrefecido, enquanto era suavemente agitada com uma pipeta de Pasteur. Esta solução diluída foi centrifugada durante 10 min. a 10 000 rpm (12 000 g). A bola assim formada foi ressuspendida em 1,5 ml de tampão básico e homogeneizada manualmente com 8 pancadas num homogeneizador de copo Wheaton-copo de 7 ml. A preparação sinaptossómica suspendida foi congelada a -70ºC até ser utilizada.

(4) PROCEDIMENTO DE ENSAIO

O procedimento de ensaio é similar ao descrito antes sob a denominação "Microrrastreio para Bloqueadores do Canal de Cálcio do Tipo-L".

A preparação sinaptossómica foi derretida em gelo e diluída até 500 µl com tampão de K baixo em gelo-frio. Uma porção de 3,2 µl foi aquecida a 30ºC durante 3 min. um pouco antes da adição de 1 ul de DOC1. Após pré-incubação, foram adicionados 4,2 µl de stock de $^{45}Ca^{2+}$, tanto K baixo como K alto, tendo sido a captação de cálcio

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

interrompida após 5 segundos com 900 µl de tampão interruptor. O filtro foi 3 x limpo com 5 ml de tampão interruptor de cada vez. O filtro foi então removido e colocado num frasco de cintilação contendo 10 ml de cocktail de cintilação de hidroflúor e agitado vigorosamente até ser dissolvido. Foi usado um contador de cintilação beta para contar cada frasco durante 5 min.

Os filtros usados foram Millipore HA 0,45 um # HAWP 025 00 e para limpeza dos filtros foi utilizado um Brinkmann Dispensette. Foi usado o tampão interruptor para pré-humidificar o filtro antes da aplicação dos sinaptossomas.

(5) RESULTADOS

Os resultados experimentais (não ilustrados) indicam que o DOC1 produz algum bloqueio na captação de cálcio nos sinaptossomas estimulada por K^+. Contudo, nenhuma das concentrações testada (até 0,5 unidades/ml) inibiu a captação de cálcio em mais do que 30%. Por conseguinte, o DOC1 é substancialmente menos efectivo e potente no bloqueio dos canais de cálcio sinaptossómicos do que na sua capacidade para bloquear os canais de cálcio do tipo-L das células de pituitária do clone GH_4C_1.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Estudos Electrofisiológicos do DOC1

(1) PREPARAÇÃO DE CÉLULAS

A actividade do DOC1 foi examinada através de experiências electrofisiológicas em duas linhas de células de mamíferos que apresentam diferentes sub-classes de canais de cálcio: células pituitárias clonais de rato da linha GH_4C_1 que têm canais de cálcio do tipo-L, e células de neuroblastoma de murino da linha N1E-115, uma linha celular bastante disponível (neste caso obtida através Dr. Mark Fishman, Massachusetts General Hospital), que apresenta canais de cálcio do tipo-L, -T, e -R [Knapp e outros

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

(1990) Soc. for Neurosci. Abs. 16:678].

As células GH_4C_1 foram mantidas a tratadas conforme foi descrito antes sob o título "Microrrastreio para Bloqueadores dos Canais de Cálcio de Tipo-L". Imediatamente antes das experiências electrofisiológicas foram fornecidas fracções de células ressuspendidas de fresco á camara de registo.

As células NE-115 foram desenvolvidas a 37ºC num meio com suplemento F-12 de Ham com 10% de soro fetal de vitelo. As culturas existentes, mantidas em frascos de poliestireno, foram alimentadas uma vez por semana e foi separado 1:10 uma vez por semana. Para experiências electrofisiológicas 1:4 ou 1:8 das células foi separado e recolocado em pratos de poliestireno de 35 mm não tratados ou em vidros de lábios cobertos, envolvidos com poli-D--lisina (4 µg/ml)+ + lamina (10 µg/ml). As células foram induzidas a diferenciarem-se com a adição de óxido de dimetilenxofre a 2% ao meio de cultura durante 7-21 dias [Quandt, F.N. e outros (1984) Neuroscience 13:249]. Este tratamento induz as células N1E-115 a assumir uma morfologia semelhante a um neurónio e a apresentar uma elevada densidade de canais de cálcio dependentes da diferença de potencial.

(2) MÉTODOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Foram registadas correntes iónicas através dos canais de cálcio com eléctrodos de embutir em configuração para fixar a diferença de potencial em toda a célula [Hamill, O. e outros (1981) Pflugers Arch. 391:85]. As células foram rápidamente colocadas numa solução extracelular contendo (em mM) 130 TEA-Cl, 5 $BaCl_2$, 10 glucose, 10 HEPES, 0,5 µM TTX, pH 7,2. A solução, intracelular (pipeta) continha (em mM) 125 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg_2ATP, pH 7,2.

Estas soluções foram projectadas, para

1 AGO. 1992

impedir a existência de correntes através de todos os canais iónicos dependentes da voltagem, com excepção dos canais de cálcio. O Ba^{2+} foi usado como o transportador de carga para evitar a inactivação dependente de cálcio dos canais de cálcio. O potencial da membrana celular foi controlado electrónicamente. A corrente através dos canais de cálcio foi retirada por despolarizações graduais dos potenciais de repouso negativos. O DOC1 foi dissolvido na solução extracelular e aplicados às células por ejecção pressorizada a partir de uma pipeta de vidro.

(3) RESULTADOS

Nas células GH_4C_1, examinámos o efeito do DOC1 sobre correntes sustentadas induzidas por despolarizações relativamente extensas situadas entre-10 e +20 mV. Sob estas condições, é provável que a corrente seja sobretudo através dos canais de cálcio do tipo-L (Mattson, D.R. & Armstrong, C.M. J. Gen Physiol, 87:161-182, 1986). Em consistência com os resultados das experiências do fluxo de cálcio, o DOC1 (0,4-1,0 U/ml) bloqueou reversivelmente uma grande fracção (até 80%) de corrente através dos canais de cálcio (Fig. 10).

A acção do DOC1 sobre classes adicionais dos canais de cálcio foi examinada nas células N1E-115. Nestas experiências, os canais do tipo-L foram bloqueados por inclusão de 10 µM de nimodipina (uma concentração de saturação) na solução extracelular. Sob estas condições, as células N1E-115 continuaram a mostrar uma passageira corrente de cálcio de baixo limiar (tipo-T), assim como um ou mais componentes de corrente de alto limiar não inibidos pelos antagonistas dihidropiridina [Knapp, A.G. e outros Soc. Neurosci. Abstr. (1990) 16:678].

Como é mostrado na Fig. 11A e na Fig. 11B, o DOC1 (1,0 U/ml) provocou a inibição da corrente de alto limiar através dos canais de cálcio mesmo na presença contínua da nimodipina. O DOC1 não afectou substancialmente

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

P. 460/1992

a corrente do tipo-T induzida por fracas despolarizações das potenciais de repouso negativos (Fig. 11C). As acções do DOC1 foram reversíveis após remoção e dependeram da dose.

Como é mostrado na Fig. 12, o DOC1 bloqueou um máximo de 45% da corrente de alto limiar permanecendo depois do tratamento com nimodipina. A concentração que produziu metade da inibição máxima foi 0,37 U/ml.

Resumo das Propriedades Salientes do DOC1

No quadro apresentado a seguir estão resumidos os resultados das experiências desenvolvidas para estudar o efeito do DOC1 sobre os canais de cálcio através da medição da captação de cálcio 45 e do método electrofisiológico, os quais foram anteriormente descritos.

Como é mostrado, o DOC1 possui um elevado grau de selectividade (na ordem de duas unidades log) pelas correntes de Ca em relação às correntes de Na. Notavelmente, em concentrações em que produz um bloqueio substancial das correntes de cálcio (tipo-R) resistentes à dihidropiridina, não foi observado nenhum bloqueio dos supostos canais do tipo-T. Assim, parece que o DOC1 pode ser um bloqueador selectivo de alto limiar, inactivando lentamente os canais Ca com um espectro de eficácia mais largo do que a nimodipina.

As implicações deste perfil farmacológico são que tal composto (se for capaz de penetrar no cérebro) pode também, adicionalmente à produção de vasodilatação cerebral, bloquear directamente, e numa proporção maior do que a nimodipina, a entrada de Ca nos corpos das células nervosas mediada pelo canal de cálcio. Por esta razão, pode existir uma vantagem competitiva sobre a dihidropiridina na prevenção do excesso de Ca nos neurónios.

A marcante especificidade do DOC1 para os canais de Ca em relação aos canais de Na ou K é ilustrada

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

abaixo.

Resumo das Propriedades do DOC1

Propriedade	IC_{50}, unidades/ml
Bloqueio dos canais tipo-L sensíveis à DHP,	
Células pituitárias de clone GH_4C_1, captação de ^{45}Ca	0.4 - 1.5*
Células pituitárias de clone GH_4C_1, electrofisiol	1.5 (inchar)
Bloqueio da captação de ^{45}Ca estimulada por K (canais-L?)	
Neurónios corticais	0.1 - 0.4**
Bloqueio dos canais tipo-R resistentes à DHP,	
Células N1E-115 (electrofisiol)	0.4
Bloqueio de baixo limiar, inactivando os canais (T?),	
Células N1E-115 (eletrofisiol)	nenhum
Bloqueio da corrente de NA, células N1E-115	não signif.
Bloqueio da corrente de K, células N1E-115	(12% a 1U/ml)

* efeitos inibidores consistentes; IC_{50} variado nas culturas GH_4C_1

** algumas culturas de neurónios corticais parecem insensíveis ao DOC1 e DHP; IC_{50} variado nas culturas sensíveis

Confirmação da Actividade Biológica do DOC1 Sintético

O composto sintético obtido pelo processo descrito anteriormente era idêntico em todos os aspectos ao produto natural. A sua informação espectral, por exemplo, IR, 1H NMR e 13C NMR, coincide bem com o composto natural.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

AGO/1992

O perfil da HPLC do produto sintético era idêntico ao do produto natural, e eles co-eluiram juntos sobre uma coluna de fase inversa C18 com um tempo de retenção de 12,47 min.

A estrutura do DOC1 foi elucidada. O composto foi sintetizado em quantidades de grama, e a actividade antagonista do cálcio do DOC1 sintético assemelha-se quantitativamente à do composto que ocorre naturalmente, com base no ensaio de microrrastreio das células GH_4C_1, realizado da forma descrita anteriormente. A caracterização electrofisiológica apiou, ainda, a confirmação da sua actividade.

A Fig. 13 ilustra a importante descoberta de que os canais de cálcio dos neurónios, com as características electrofisiológicos dos canais de cálcio do tipo-L, não são uniformemente sensíveis aos bens conhecidos antagonistas dos canais de cálcio do tipo-L. Mais especificamente, o ião bário foi usado como o veículo de carga, para minimizar a inactivação do canal Ca dependente. A inibição de uma percentagem da corrente de Ca^{2+} de alto limiar (o) e de baixo limiar (Δ), resistente à DHP, pelo DOC1 foi realizada em células (N1E-115) de neuroblastoma com diferença de potencial fixa. As células foram banhadas em 5 μM de nimodipina. As correntes de C^{2+} de alto limiar (corrente R, círculos abertos), resistentes à DHP, foram induzidas mantendo as células a -50 mV e passando em seguida o potencial de membrana para +10 mV. As correntes de Ca^{2+} de baixo limiar (corrente T, triângulos abertos) foram induzidas matendo as células a -90 mV e passando em seguida o potencial de membrana para -25 mV. O DOC1 foi dado via ejecção pressurizada. A inibição percentual das respostas das células do conjunto de controlo foi delineado como uma função da concentração de DOC1. Cada ponto representa a média e SEM da resposta de uma média de 3-4 células. O gráfico mais pequeno mostra a inibição porcentual do total da corrente Ca^{2+} de alto limiar por 10 μM de nimodipina e

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

60 μM de DOC1. Cada barra representa a média e SEM da resposta de uma média de 5-6 células.

Como é mostrado no gráfico mais pequeno, a maioria das correntes de cálcio de alto limiar. inactivadas lentamente, registadas nas células de neuroblastoma N1E-115 não é inibida na presença de 10 μM de nimodipina, uma concentração saturante que inibiria completamente as correntes dos canais de cálcio de tipo-L no sistema cardiovascular. Em contraste, o DOC1 inibe a maioria da corrente (mediada pelo canal-R) remanescente na presença da nimodipina.

A selectividade do DOC1 sintético por canais de tipo-R em relação aos canais do tipo-T também é notada na Fig. 14. Esta selectividade é graficamente demonstrada na Fig. 14, que mostra o efeito do DOC1 sobre duas classes de correntes de cálcio registadas numa célula de neuroblastoma N1E-115. O traçado do lado direito mostra a ausência de efeito de 60 μM de DOC1 sobre correntes de cálcio de baixo limiar passageiras (correntes de canal tipo-T) em células N1E-115. O traçado do lado esquerdo mostra que 60 μM de DOC1 são capazes de inibir correntes de cálcio de alto limiar (corrente tipo-R) em células N1E-115.

Mais especificamente, os resultados do painel direito mostram que a ejecção pressurizada da droga sobre as células teve pouco efeito (bloqueio a 11% nas células aqui mostradas) em relação ao seu efeito sobre as correntes do tipo-R. Os efeitos da droga, após a sua remoção, foram rapidamente reversíveis; nalguns casos, porém, a recuperação foi ofuscada por diminuição da corrente como é demonstrado neste exemplo. Assim, o pequeno grau de bloqueio aparentemente mostrado pode ser em grande parte um artefacto da diminuição de corrente. Os resultados no painel esquerdo, por outro lado, mostram que a ejecção pressurizada da droga sobre as células bloqueou estas correntes num grau significativo (53% de inibição nas

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

14. AGO. 1992

células aqui mostradas). Os efeitos da droga, após a sua remoção foram rapidamente reversíveis. Os protocolos de estímulos são mostrados por cima de cada painel. Barra de calibração -80 pA, no painel direito; 70 pA, no painel esquerdo.

O que importa destacar é que todos os traços foram registados na presença de dez micromolares de nimodipina, outro antagonista do cálcio tipo-L. Mais uma vez, esta concentração de nimodipina inibiria completamente as respostas geradas através dos canais de cálcio do tipo-L nas células musculares lisas ou cardíacas (não ilustrado).

Com base na capacidade do DOC1, para inibir a classe dos canais de cálcio de alto limiar, inactivados lentamente, nas células nervosas e resistentes às dihidropiridinas, é evidente que podem ser descobertas novas classes de pequenas moléculas orgânicas com um novo espectro de acção de potencial de acção terap@utica.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Vantagens de Seleccionar Compostos que Afectam o transpote Trans-Membrana pelo Microrrastreio do Método de Entrada

Certos produtos naturais escassos e certos compostos sintéticos estão disponíveis em quantidades limitadas podendo ser muito caros. De forma a identificar entre estas fontes, precisa e quantitativamente, as actividades biológicas relevantes em termos terap@uticos com o máximo de economia, é desejável dispor de um sistema de ensaio que possa obter a quantidade máxima de informação a partir uma quantidade miníma de material. Além disso, para rastrear e avaliar eficientemente grandes bibliotecas químicas de compostos, o sistema de ensaio de rastreio deve ser um sistema de "elevada produção", capaz de avaliar muitos compostos em poucas horas.

Em princípio, os ensaios de união de radioligantes são capazes de ter uma elevada produção no ras-

P.I. AGC. 1992

treio de compostos que afectam o transporte de moléculas ou iões para as células, organelos ou vesículas membranosas. Dado que, tais ensaios são baseados na união dum radioligante a um receptor conhecido, acontece que as drogas recentes que interagem com sítios receptores distintos não reconhecidos previamente não serão identificadas por um tal método de rastreio. Além disso, é muitas vezes impossível inferir só através de estudos de união de radioligantes quais seriam os efeitos funcionais de um composto quando ele ocupasse o sítio de união, isto é, será que ele potenciaria ou antagonizaria a resposta biológica normal?

Em certos casos, ensaios funcionais devidamente delineados podem consumir quantidades mínimas dos compostos a avaliar (por exemplo, abordagens electrofisiológicas para identificação dos antagonistas do canal iónico); todavia, tais ensaios funcionais não são geralmente capazes de oferecer uma elevada produção.

As considerações anteriores levaram ao desenvolvimento dum método de rastreio por microrrastreio de captação, uma recente abordagem para a descoberta de novas drogas. As vantagens deste método de rastreio são as seguintes:

(1) Consumo Mínimo de Material

Através do emprego duma estratégia em que o ensaio é realizado com volumes muito pequenos (tipicamente menos do que 25 µl e pode ser tão pouco como 8 µl, como foi mostrado anteriormente na identificação do DOC1 e DOC3), são consumidos montantes mínimos de material.

(2) Determinação Directa da Função Terapêutica Relevante

Para identificar os modificadores dos canais de iões, bombas de iões, ou doutros sistemas de transporte nas membranas celulares são empregues radioisótopos de moléculas actualmente transportadas pelos referidos siste-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

mas de transporte. O ensaio é delineado para identificar e quantificar a natureza do efeito de compostos com interesse acerca dos referidos sistemas de transporte.

No exemplo corrente, realizaram-se experiências para estudar o efeito do DOC1 na união selectiva de nimodipina [^{3}H] aos sítios de união da dihidropiridina nos canais de cálcio do tipo-L das membranas cerebrais de rato. Outros compostos que actuam através do mesmo sítio de união como as dihidropiridinas inibirão esta união da nimodipina [^{3}H]. Os resultados das nossas experiências não ilustrados) mostraram que o DOC1 não inibia significativamente a união de nimodipina [^{3}H], quando adicionado ao ensaio numa concentração até 0,6 unidades/ml. Nas mesmas experiências, a nifedipina, um composto de dihidropiridina similar à nimodipina, mostrou inibir fortemente a união de nimodipina [^{3}H], dando 50% de inibição a cerca de 20 nM. Os resultados experimentais relacionados encontra-se nas Figs.11A, 11B e 12 e nos respectivos textos de acompanhamento.

O facto de, quando usado em concentrações bem acima das requeridas para inibição dos canais do tipo-L ou -R não existir inibição da ligação de nimodipina aos canais do tipo-L, apoia o argumento que o DOC1 actua num sítio distinto e único nos seus alvos que são os canais de cálcio. Esse facto, também demonstra que o DOC1, que foi identificado pelo nosso sistema de ensaio de rastreio, não teria sido descoberto por este tipo de sistema convencional de ensaio de união dum radioligante, destacando assim as vantagens da abordagem por rastreio ensinada pelo invento.

(3) Elevada Produção

O sistema de ensaio é designado desta forma para que diariamente possa ser analisada uma grande quantidade (dúzias ou mais) de compostos candidatos. As manipulações físicas envolvidas nos ensaios lembram em simplicidade e repretitividade o tipo de manipulações empreendidas, por exemplo, na realização de ensaios de união de radioligantes

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

1 AGO 1992

a sítios receptores ligados à membrana. Em muitos casos, os ensaios de rastreio podem ser automatizados usando muita da mesma maquinaria empregue nos ensaios de união de substâncias radioligantes.

Duas realizações, entre outras, deste método de rastreio foram descritas anteriormente, nomeadamente, (a) um ensaio para antagonistas dos canais de cálcio tipo-L (cardiovasculares e neuronais) de células pituitárias clonais (GH_4C_1), e (b) um ensaio para antagonistas dos canais de cálcio pré-sinápticos que controlam a libertação de neurotransmissor pelos organelos, isto é, terminais de nervos cerebrais (sinaptossomas). Ambos os ensaios foram usados para ajudar a descobrir e caracterizar o DOC1 e o DOC3.

Outras variantes desta abordagem incluiem um ensaio de rastreio que emprega suspensões de células desenvolvidas em leitos. Isto pode ser desejável, dado que certos alvos terapêuticamente relevantes para a descoberta de drogas não são encontrados em células ou organelos facilmente desenvolvidos ou manipulados em suspensão livre. Por exemplo, os neurónios em cultura estendem frágeis processos que sofrem facilmente rupturas, e por esta razão devem ser desenvolvidos num suporte sólido e estável. Desenvolvendo tais células (por exemplo, linhas de células de neuroblastoma) em leitos, as célulass podem estender livremente os processos que aderem aos leitos, evitando que sofram danos enquanto são manipuladas em suspensão duma forma que aliás se assemelha às manipulações de células GH_4C_1 e sinaptossomas descritas anteriormente.

Alternativamente, este ensaio de rastreio pode realizar-se empregando suspensões de células desenvolvidas em cavidades de fibras por um raciocínio similar ao estabelecido acima. Como exemplo, as células podem ser desenvolvidas em feixes de fibras com cavidades. As fibras com cavidades podem ser individualmente cortadas com uma

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

- 4 AGO. 1992

tesoura dos feixes, ligadas, e empregues em estudos de fluxos radioisotópicos.

Pela mesma razão, pode ser desejável para conduzir um ensaio de rastreio empregar células desenvolvidas em filtros ou noutros meios microporosos a fim de se providenciar um suporte sólido e estável. O ensaio de fluxo radioisotópico pode ser realizado in situ sobre uma pequena porção do filtro, essa porção do filtro pode ser colocada num filtro maior actuando como um "transportador", e o isótopo extracelular pode ser removido por filtração.

Uso de Microensaios para Rastrear os Venenos de Aranhas Caçadoras

Os microensaios mencionados acima foram usados para rastrear o veneno de aranhas caçadoras de 3 famílias diferentes, cujos comportamentos são descritos a seguir.

A. Família PISAURIDAE

Estas insinuantes aranhas de oito olhos não constroem uma teia, excepto as teias das mais novas que aparentemente são apenas locais de descanso ou de protecção enquanto mudam de revestimento. As aranhas perseguem as presas activamente sobre o solo, na vegetação ou, nalguns casos, sobre a superfície de lagos ou charcos. Estas últimas espécies são chamadas aranhas pescadoras porque têm sido observadas a enfiar o extremo da perna dentro da água como um chamariz, ferrando de seguida um pequeno peixe que tenham conseguido atrair. A Dolomedes okefenokiensis é um dos membros das aranhas pescadoras e foi recolhida na Florida.

B. Família CITENIDAE

As aranhas desta família tropical, a quen foi dado o nome comum de aranhas vagabundas, não constroem uma teia mas são caçadoras activas, que procuram as suas

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

ASO 1992

presas no solo ou entre a vegetação rasteira. As aranhas Ctenus captiosus, preferem locais escuros tais como debeixo das rochas, gretas e cavidades nas árvores. Também elas foram recolhidas na Florida. A Phoneutria também é um membro desta família.

C. Família **LYCOSIDAE**

A Lycosidae caça principalmente no solo, usando a fina visão providenciada pelos seus olhos grandes, apontando para a frente. Foi-lhes dado o nome comum de aranhas lobo e são encontradas nos campos e nos jardins, entre bocados de folhas nos terrenos arborizados ou nas florestas, nas dunas de areia e nos desertos. Algumas espécies vivem nas superfícies lamacentas de pântanos salgados e outras passam a sua vida andando às voltas sobre a superfície de águas paradas caçando activamente. A **Sosippus californicus**, ao contrário das outras aranhas lobo, constrói uma teia laminar como a Agelenidae (aranhas de teia de funil), mas o comportamento da aranha é muito parecido com o das aranhas lobo vivendo livremente e caçando activamente as suas presas. As aranhas desta espécie foram recolhidas em Wickburg no Arizona, e procriadas para formar uma colónia por Chuck Kristensen, Spider Farm, Arizona.

A Fig. 15 mostra o perfil da actividade antagonista do canal de cálcio tipo-L em fracções do veneno da ranha **Dolomedes okefenokiensis** separadas por HPLC usando o ensaio de microrratreio. O veneno em bruto (40 µl) foi separado por HPLC de fase invertida sobre uma coluna C18 (100 x 250 mm, 5 µm, 100 Å), usando um gradiente de acetonitrila (---) em TFA a 0,1% a uma velocidade de fluxo de 4,0 ml/min. A eluição foi monitorizada por absorvência a 214 nm (---), e as fracções foram recolhidas manualmente de acordo com perfil da eluição. Depois de secas e reconstruídas no tampão básico, uma porção equivalente a 0,3 µl de

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

veneno em bruto foi pré-incubada com células GH4C1 durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi medida a captação de $45Ca^{2+}$ durante um minuto em HBBS contendo 2µCi/0,008 ml de $45Ca^{2+}$ com 5 mM K^+ (KB) ou 67 mM K^+ (KA). A captação de $45Ca^{2+}$ estimulada pelo K^+ foi calculada subtraindo a contagem de (KB) à contagem de (KA). Os resultados são expressos em % da inibição (+/- SEM) obtida comparada com a dos controlos, nos quais foi usado o tampão (básico) HBBS em vez das fracções de veneno.

A Fig. 16 mostra o perfil da actividade antagonista do canal de cálcio sinaptossómico de fracções do veneno da aranha **Ctenus captious**, separadas por HPLC usando o mesmo método de rastreio. Mais especificamente, a uma coluna de filtração por gel Biogel P6 foi aplicado veneno em bruto em ácido acético a 1%, de forma a que fossem removidos do veneno os componentes de elevado pelo molecular (PM 6 000). O maior pico, que eluiu entre 0,85 e 1,4 do volume de suporte, foi então separado por HPLC de fase invertida em coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, 100 Å), usando um gradiente de acetonitrila (----) em TFA a 1% a uma velocidade de fluxo de 1,0ml/minuto. A eluição foi monitorizada por absorvência a 214nm (----), e as fracções foram manualmente recolhidas de acordo com o perfil da eluição. Depois de seca e de reconstruida no tampão básico, uma porção equivalente a 0,4 µl de veneno em bruto foi pré-incubada com 3 µl de preparação sinaptossómica durante 5 minutos a 30oC. Foi medida, durante 5 segundos, a captação de $45Ca^{2+}$ em tampão básico contendo 1µ Ci/0,008 ml de $45Ca^{2+}$ com 3 mM de K^+ (kb) ou 75 mM de K^+ (KA). A entrada de $45Ca^{2+}$ estimulada pelo K^+ foi calculada subtraindo a contagem de (KB) à contagem de (KA). Os resultados são expressos em % da inibição (+/- SEM) obtida comparada com a dos controlos, nos quais foi usado o tampão (básico) HBBS em vez das fracções de veneno.

Os resultados do microrrastreio do veneno da

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

AGO. 1992

aranha **Sosippus californicus** são mostrados na Fig. 17. O veneno em bruto (14 µl) foi separado por HPLC de fase invertida sobre uma coluna C18 (100 x 250 mm, 5 µm, 100 Å), usando um gradiente de acetonitrila em TFA a 0,1% a uma velocidade de fluxo de 4,0 mil/min. A eluição foi monitorizada por absorvência a 214 nm (traço superior) e a 254 nm (traço inferior), e as fracções foram manualmente recolhidas de acordo com o perfil da eluição. Depois de secas e reconstruídas no tampão básico, uma porção equivalente a 0,3 µl de veneno em bruto foi pré-incubada com células GH4C1 durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi medida a entrada de 45 Ca^{2+}, durante 1 minuto, em tampão básico contendo 2 µCi/0,008 ml de 45 Ca^{2+} com 5 mM de K^+ (KB) ou 67 mM de K^+ (KA). A captação de 45 Ca^{2+} estimulada pelo K^+ foi calculada subtraindo a contagem de (KB) à contagem de (KA).

O veneno da **Sosippus californicus** tem pelo menos seis componentes que, numa diluição de 1/35, bloqueiam a captação de entrada de Ca^{2+}, estimulada pelo K mediada pelos canais do tipo-L (Fig. 17). Quatro destes componentes (assinalados, por setas verticais), numa diluição de 1/35, em microrrastreio produzem mais de 70% de bloqueio da captação de 45 Ca pelos canais tipo-L das células GH4C1. A quantidade de material necessária para produzir este bloqueio corresponde a material derivado de menos de 0,25 µl de veneno em bruto. Um dos componentes do veneno (assinalado por um "X" perto do centro do traço da HPLC) estimula substancialmente a capatação de 45 Ca. Isto, corresponde ao pico donde derivou o péptido formador do poro "SA-3" [Kobayashi, K. e outros (1989), Soc.Neurosci. Abs., 15:1301], demonstrando a capacidade deste ensaio para distinguir entre antagonistas do cálcio (inibição da captação e a actividade ionofora indesejável sobre a qual este ensaio tem um efeito oposto.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

- 1 AGO. 1992

Uso dos Compostos Reivindicados

O DOC1, DOC3 e seus similares, quer produzidos a partir de recursos naturais, quer preparados por métodos sintéticos, podem ser usados para tratamento in vivo de estados caracterizados por um insuficiente ou excessivo afluxo de cálcio às células, como nos casos de AVC, traumatismo craneo-encefálico, hipertensão, angina de peito, e outros assim caracterizados. Quando as células alvo pertencem a neurónios centrais, é preferivel que o composto seja acilatado para aumentar a sua permeabilidade através da barreira hermeto-encefálica.

Alternativamente, estes compostos podem ser usados como imunogénios para preparação de anticorpos contra venenos de aracnídeos. Além disso, eles podem também ser usados como exploradores no estudo da função e estructura de vários tipos de canais de cálcio.

Quando estes compostos são usados como drogas, a quantidade a ser administrada dependerá, designadamente, da gravidade do estado a ser tratado, da via de administração escolhida, e em último lugar da decisão do médico ou do veterinário intervenientes. Essa quantidade determinada pelo médico ou veterinário será referida daqui em diante como a quantidade "terapêuticamente eficaz". Por exemplo, quando uma toxina de aranha com um peso molecular entre 200 e 1000 Da foi usada como um anticonvulsivante, foram administrados por via intravenosa 2µM/Kg [Jackson H., e outros (1989) Ann. Rev. Neurosci. 12:405].

O composto activo pode ser administrado por qualquer via apropriada ao estado a ser tratado. Preferivelmente, o composto é injectado na corrente sanguínea do mamífero em tratamento. Será prontamente observado pelos técnicos que a via preferível variará com o estado que está a ser tratado.

Embora seja possível administrar o composto

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

activo numa forma pura ou substancialmente pura, é preferivel apresentá-lo como uma formulação ou um preparado farmacêutico. As formulações do presente invento, tanto para uso veterinário como humano, compreendem um composto activo do invento, como descrito antes, em conjunto com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis para o mesmo, e opcionalmente outros ingredientes terapeuticos.

O veículo deve ser "aceitável" no sentido de ser compativel com os outros ingredientes da formulação e de não ser prejudicial para o receptor. Desejávelmente, a formulação não deve incluir substâncias com as quais se saiba que os compostos contendo indol ou poliamina são incompatíveis.

As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de doses unitárias e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bem conhecidos na arte farmacêutica. Todos os métodos incluem o passo de associar o ingrediente com o veículo, o qual constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas associando íntima e uniformemente o ingrediente activo vom veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, moldando o produto na formulação desejada.

As formulações adequadas para administração parentérica compreendem, convenientemente, soluções aquosas estéreis do ingrediente activo com soluções que são preferivelmente isotónicas com sangue do receptor. Tais formulações podem ser convenientemente preparadas dissolvendo ingredientes activo sólido em água para produzir uma solução aquosa, e tornando as referidas soluções estéreis. A formulação pode ser apresentada em recipientes de dose unitária ou múltipla, por exemplo, em frascos ou ampolas seladas.

Outras Realizações

A descrição antecedente limitou-se a realizações específicas deste invento. Contúdo, é evidente que podem ser efectuadas variações e modificações a este invento, com a consecução de algumas ou todas as vantagens deste invento.

Por exemplo, outros componentes, tais como péptidos, foram identificados no veneno de **Dolomedes okefenokiensis.** Alguns destes compostos, por uma acção similar à do DOC1 e DOC3, mostram também actividade de bloqueio do canal de cálcio e estão dentro do âmbito do presente invento. Adicionalmente, é de esperar que os compostos sintéticos que têm estructuras que representam variações da estrutura poliamina do DOC1 e DOC3 funcionem duma forma similar ao DOC1 e DOC3, encontrando-se tais compostos no âmbito do invento.

Outras realizações estão inseridas nas reivindicações seguintes.

Lisboa, -4 AGO. 1992

Por CAMBRIDGE NEUROSCIENCE, INC.

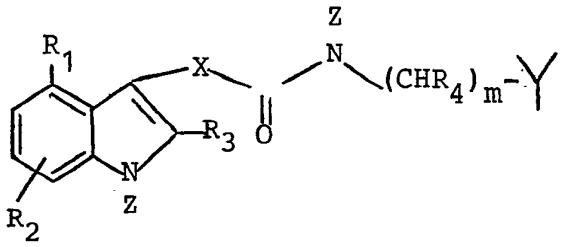
VASCO MARQUES LEITE
Agente Oficial
da Propriedade Industrial
Cantório - Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 [redacted]

Mod. 71 - 23.000 ex. - 90/08

ADR 1593

DESCRIÇÃO
REIVINDICAÇÕES

1ª. - Composto substancialmente puro da fórmula:



caracterizado por

cada R_1 e R_2 ser independentemente H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, OCH_3, OCF_3, benziloxi, SH, SCH_3, NH_2, N_3, NO_2, CN, COOH, $CONH_2$, CH_2CONH_2, ou SO_2NH_2;

R_3 ser H, CH_3, COOH, $CONH_2$, ou COOR onde R é alquilo C_{1-4};

cada R_4, ser independentemente, H ou alquilo C_{1-6};

X ser CH_2, CH_2CH_2, CH=CH, ou $CH_2CH_2CH_2$;

Y ser $\overset{Z}{N}-D$ ou $T-\overset{Z}{N}-D$ onde T é $\overset{Z}{N}(CH_2)_n$,

$\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n$, $\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n$, ou

$\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n-\overset{Z}{N}(CH_2)_n$

cada Z ser independentemente H, CH_3, ou Q onde Q é um acilo hidrofóbico, benzoilo, fenacetilo, benziloxicarbonilo, alcoxicarbonilo, ou N-metil-dihidropiridina-3-carbonilo, e está ligado a N por uma ligação amida que é clivável por um enzima do sistema nervoso central endógeno;

D ser H ou $C(=NH)-NHR_5$ onde R_5 é H ou alquilo C_{1-4};

m ser um número inteiro de 2 a 12, inclusivé; e

cada n ser, independentemente, um número inteiro de 2 a

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

ABR 1993

12, inclusivé; ou um seu sal.

2ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por R_1 ser H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, NH_2, NO_2, $CONH_2$, ou SO_2NH_2.

3ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por R_2 ser H, CH_3, CF_3, F, Cl, Br, I, OH, NH_2, NO_2, $CONH_2$, ou SO_2NH_2.

4ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por R_3 ser H, CH_3, ou $CONH_2$.

5ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por R_4 ser H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, ou C_4H_9.

6ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por X ser CH_2, CH=CH, CH_2CH_2, ou $CH_2CH_2CH_2$.

7ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por Z ser H ou CH_3.

8ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por R_1 ser OH; cada R_2, R_3, R_4 e Z ser H; m ser 3 ou 5;

Y ser $-N(CH_2)_n-N(CH_2)_n-N(CH_2)_n-N-D$;

D ser H ou $\overset{NH}{\overset{\|}{C}}-CH_2$

e cada n, independentemente, ser 3, 4 ou 5.

9ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por m ser 8, 10, ou 12; e Y ser

$\underset{Z}{N-D}$, $T-NH_2$ ou $T-NH-\overset{NH}{\overset{\|}{C}}-NH_2$.

10ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Q ser acilo ou benzoilo.

11ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Q ser fenacetilo, benziloxicarbonilo, ou alcoxicarbonilo.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

12ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Q ser N-metil-dihidropiridina-3-carbonilo ligado a N por uma ligação amida.

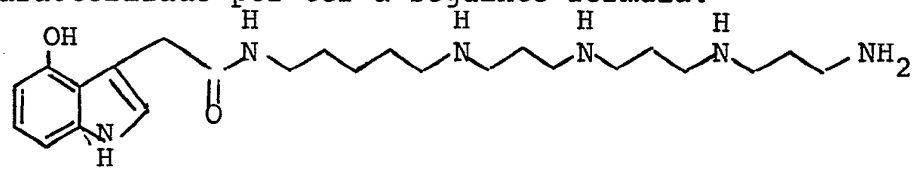
13ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por m ser 8, 10 ou 12; e Y ser NH_2 ou $NH-\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$

14ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por cada R_3 e R_4 ser H; X ser CH_2, Y ser $T-NH_2$; m ser 2, 3, 4, 5, ou 6; e cada n ser, independentemente, 2, 3, 4, 5, ou 6.

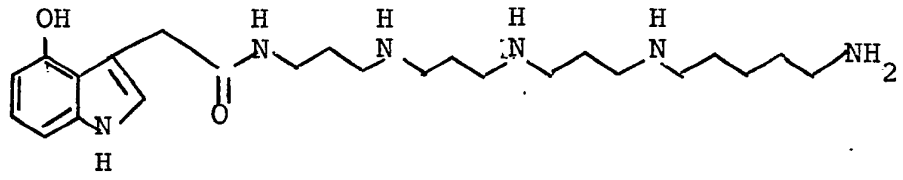
15ª. - Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por R_1 ser OH, R_2 ser H, e cada Z ser H.

16ª. - Composto de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por m ser 3 ou 5 e cada n ser, independentemente, 3 ou 5.

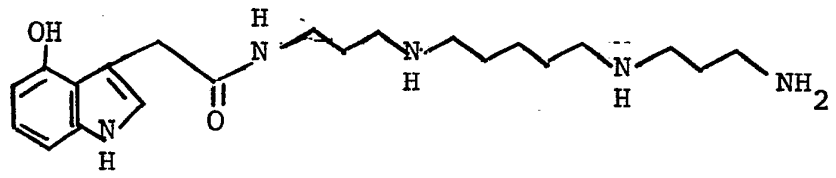
17ª. - Composto de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por ter a seguinte fórmula:



18ª. - Composto de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por ter a seguinte fórmula:



19ª. - Composto de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por ter a seguinte fórmula:

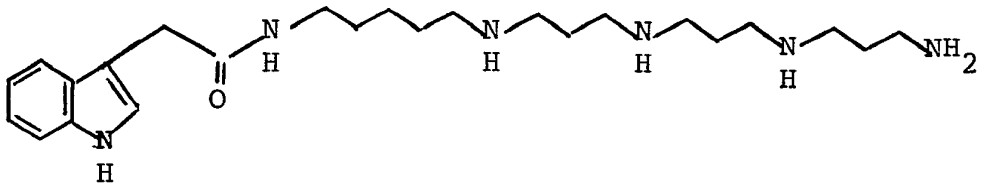


Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

1 ABR 1993

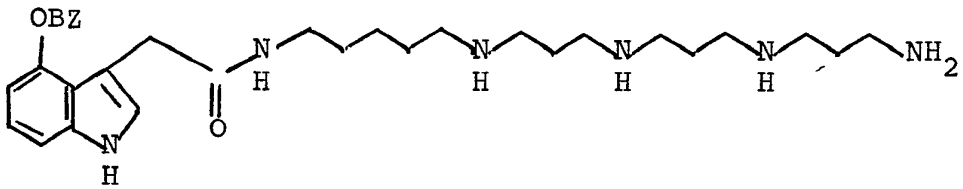
20ª. - Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por cada R_1 e R_2 ser H; e cada Z ser H e cada m e n ser independentemente 3 ou 5.

21ª. - Composto de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por ter a seguinte fórmula:



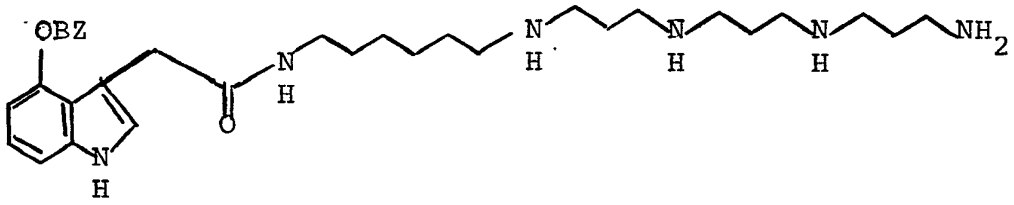
22ª. - Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por R_1 ser óxido de benzilo, R_2 ser H , cada Z ser H, e cada m e n ser, independentemente 3 ou 5.

23ª. - Composto de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por ter a seguinte fórmula:



24ª. - Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por R_1 ser óxido de benzilo, R_2 ser H, cada Z ser H, e cada m e n ser, independentemente 3 ou 6.

25ª. - Composto de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por ter a seguinte fórmula:

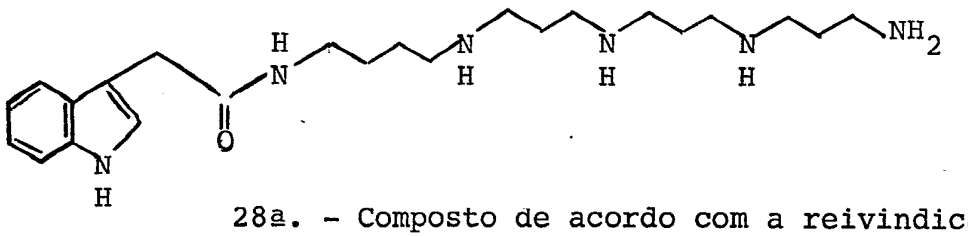


26ª. - Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por cada R_1 e R_2 ser H, cada Z ser H, e cada m e n ser, independentemente 3 ou 4.

27ª. - Composto de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por ter a seguinte fórmula:

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

ABL 1993



28ª. - Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um antagonista do canal do cálcio.

29ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por ser um antagonista tipo-R dos canais do cálcio nas células neurónicas dos mamíferos.

30ª. - Composto de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por as referidas células neurónicas serem células de nervos periféricos.

31ª. - Composto de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por as referidas células neurónicas serem células do sistema nervoso central.

32ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por ser um antagonista tipo-L dos canais do cálcio nas células neurónicas dos mamíferos.

33ª. - Composto de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por as referidas células neurónicas serem células de nervos periféricos.

34ª. - Composto de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por as referidas células neurónicas serem células do sistema nervoso central.

35ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por ser um antagonista tipo-R dos canais do cálcio nas células cardiovasculares dos mamíferos.

36ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por ser um antagonista tipo-L dos canais do cálcio nas células cardiovasculares dos mamíferos.

37ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por bloquear reversivelmente os canais do cálcio.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

ABR 1993

38ª. - Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por bloquear os canais do cálcio num grau superior ao que bloqueia os canais do sódio.

39ª. - Composição farmacêutica para o tratamento de um estado caracterizado pelo afluxo de cálcio para dentro das células, composição caracterizada por consistir numa quantidade terapêuticamente eficaz do composto da reivindicação 28 e num veículo farmacêuticamente aceitável.

40ª. - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 39, caracterizada por as referidas células serem células neurónicas.

41ª. - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 40, caracterizada por o referido composto ser capaz de atravessar a barreira sanguinea cerebral de um mamífero.

42ª. - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 40, caracterizada por o referido estado ser um acidente vascular cerebral (AVC), um traumatismo crâneo-encefálico, doença de Alzheimer, demência multienfartes, outras classes de demência, doença de Korsakoff, uma neuropatia causada por uma infecção viral do cérebro ou da espinal medula, esclerose lateral amiotrófica, convulsões, crises epiléticas, doenças de Huntington, amnésia, ou danos no sistema nervoso resultantes da redução do fornecimento de oxigénio, venenos ou outras substâncias tóxicas.

43ª. - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 39, caracterizada por as referidas células serem células cardiovasculares.

44ª. - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 43, caracterizada por o referido estado ser hipertensão, arritmia cardíaca, angina de peito, dano provocado por hipóxia do sistema cardiovascular, dano provocado por isquémia do sistema cardiovascular, enfarte do miocárdio, ou insuficiência cardíaca congestiva.

45ª. - Preparação substancialmente pura, obti-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

1 ABR 1993

da segundo as regras da arte, de um composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se encontrar presente numa aranha da família Pisauridae e funcionar como um antagonista do canal do cálcio.

46ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 45, caracterizada por o referido composto não ser um polipéptido.

47ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 46, caracterizada por o referido composto ser uma poliamina.

48ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 45, caracterizada por a referida aranha ser do género Dolomedes.

49ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 48, caracterizada por o referido composto ser uma poliamina.

50ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 48, caracterizada por a referida aranha ser da espécie okefenokiensis.

51ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 50, caracterizada por o referido composto ser uma poliamina.

52ª. - Preparação substancialmente pura, obtida segundo as regras da arte, de um composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se encontrar presente numa aranha da família Ctenidae e funcionar como um antagonista do canal do cálcio.

53ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 52, caracterizada por a referida aranha ser do género Ctenus ou Phoneutria .

54ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 53, caracterizada por a referida aranha ser da espécie Ctenus captiosus .

55ª. - Preparação substancialmente pura, obtida segundo as regras da arte, de um composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se encontrar presente

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

FL ABR 1993

numa aranha da família Lycosidae e funcionar como um antagonista do canal do cálcio.

56ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 55, caracterizada por a referida aranha ser do género Sosippus.

57ª. - Preparação de acordo com a reivindicação 56, caracterizada por a referida aranha ser da espécie californicus.

58ª. - Processo de obtenção de uma preparação dum antagonista do canal do cálcio, caracterizado por incluir as etapas de selecção duma aranha que naturalmente não utiliza teias para capturar as suas presas, de recolha do veneno da referida aranha, de fraccionamento do referido veneno, e de identificação da fracção do referido veneno que mostre bloquear a actividade dos canais do cálcio.

59ª. - Processo para identificação de uma substância capaz de afectar o transporte através da membrana de uma molécula ou de um ião, caracterizado por consistir nas seguintes etapas, num volume de reacção não excedendo os 50 microlitros:

fornecer uma preparação de células, organelos ou membranas vesiculares;

adicionar à referida preparação uma quantidade duma molécula ou dum ião marcado para ser identificável; e

comparar (a) o nível da referida molécula ou ião marcado recebido pelas referidas células, organelos ou membranas vesiculares na presença da referida substância, com (b) o nível recebido pelas referidas células, organelos ou vesículas membranosas na ausência da referida substância.

60ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por o referido volume de reacção ser menor do que 25 microlitros.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

61ª. - Processo de acordo com a reivindicação 60, caracterizado por o referido volume de reacção ser menor do que 10 microlitros.

62ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por a referida substância incluir um componente de um veneno de aranha.

63ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por a referida preparação incluir células de mamífero.

64ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por a referida preparação incluir organelos de mamífero.

65ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por a referida preparação incluir membranas vesiculares de mamífero.

66ª. - Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado por a referida molécula ou ião ser um ião metálico.

67ª. - Processo de acordo com a reivindicação 66, caracterizado por o referido ião metálico ser um ião Ca^{+2} ou Na^{+} .

68ª. - Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado por as referidas células estarem ligadas a um suporte sólido.

69ª. - Processo de acordo com a reivindicação 68, caracterizado por o referido suporte sólido incluir cordões microtransportadores.

70ª. - Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado por as referidas células estarem ligadas a um suporte microporoso.

71ª. - Processo de acordo com a reivindicação 70, caracterizado por o referido suporte microporoso incluir um filtro microporoso.

72ª. - Antagonista do canal do cálcio, caracterizado por ser identificado pelo processo de acordo com a

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

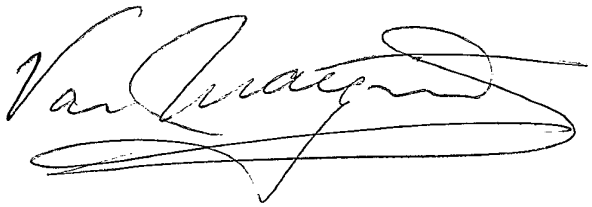
-1 ABR 1993

reivindicação 67.

73a. - Antagonista do cañal do cálcio de acordo com a reivindicação 72, caracterizado por o referido antagonista do canal do cálcio ser um constituinte de veneno de aranha.

Lisboa, -1 ABR 1993

Por CAMBRIDGE NEUROSCIENCE, INC.



VASCO MARQUES
Agente Oficial
da Propriedade Industrial
Centro - Largo da Concepção, 3, 1.º-1100 LISBOA

Mod. 71 - 20.000 ex. - 92/12

IDENTIFICAÇÃO DA FRACÇÃO DOC

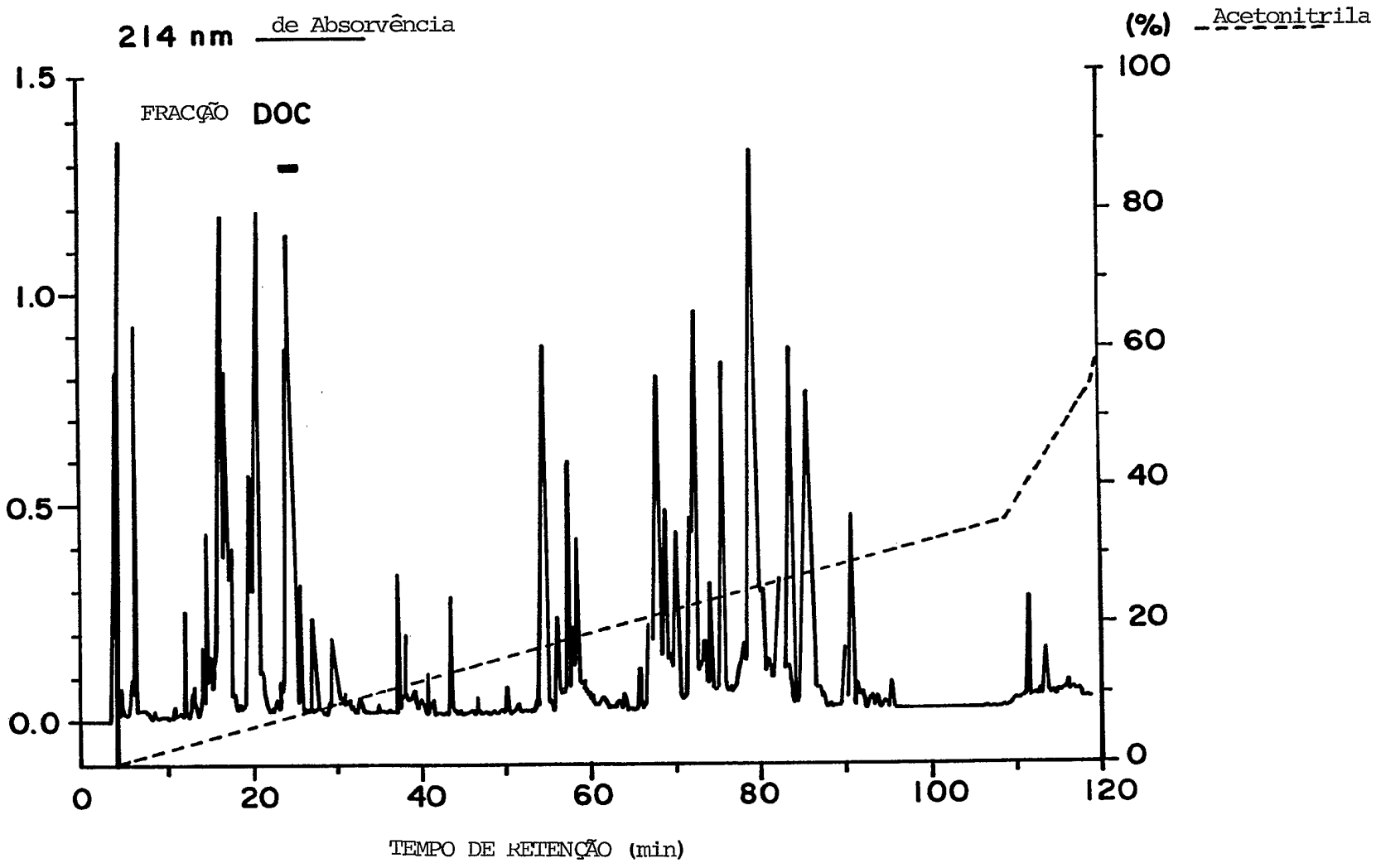


FIG. 1

SEPARAÇÃO INICIAL DO VENENO DE DOLOMEDES

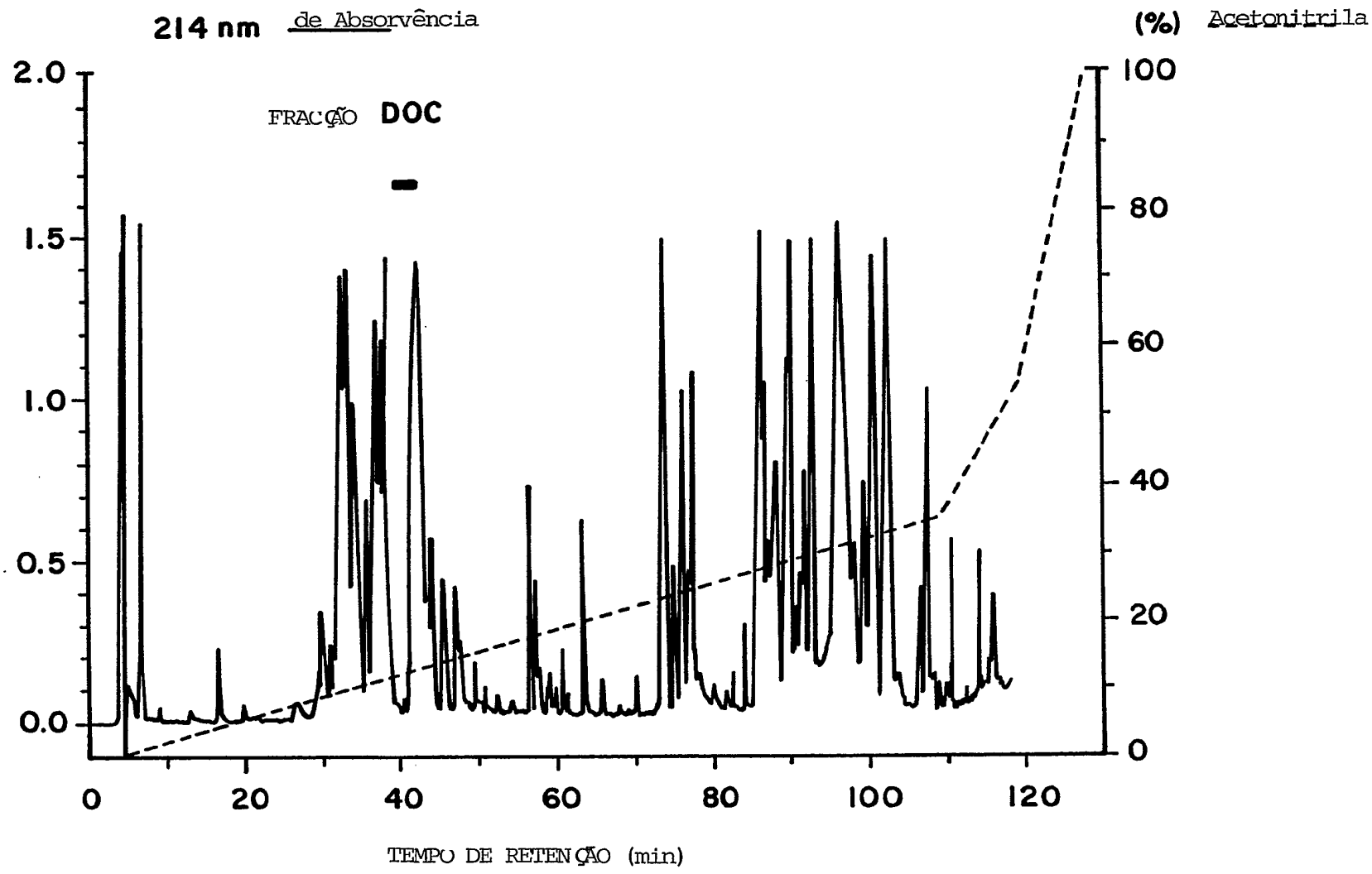


FIG. 2

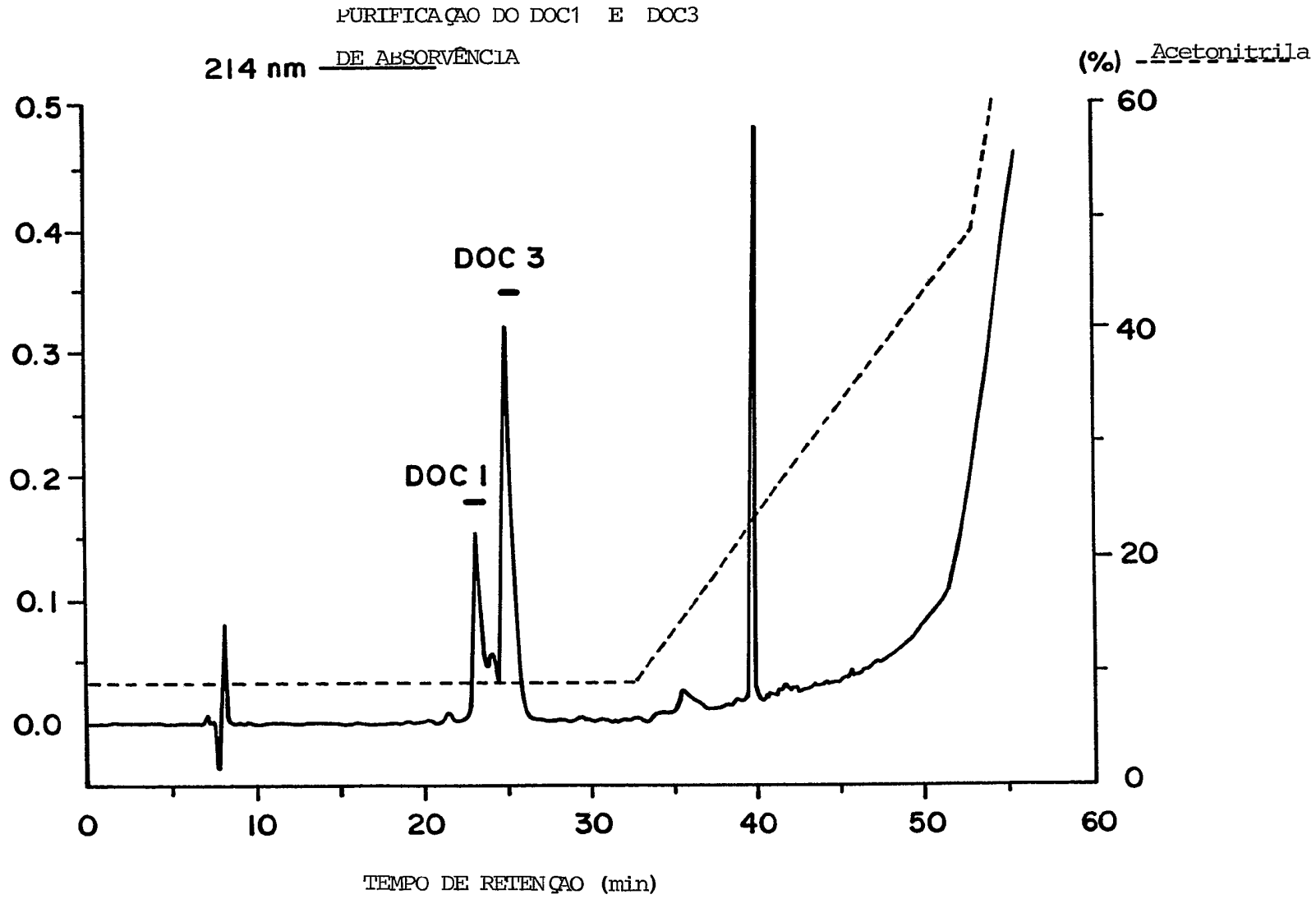

PURIFICAÇÃO DO DOC1 E DOC3
214 nm DE ABSORVÊNCIA
(%) Acetonitrila
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
60
40
20
0
DOC 3
DOC 1
0
10
20
30
40
50
60
TEMPO DE RETENÇÃO (min)

FIG. 3

ESCALA DE FRACCIONAMENTO SEMI-PREPARATÓRIO DO VENENO DA ARANHA DOLOMEDES

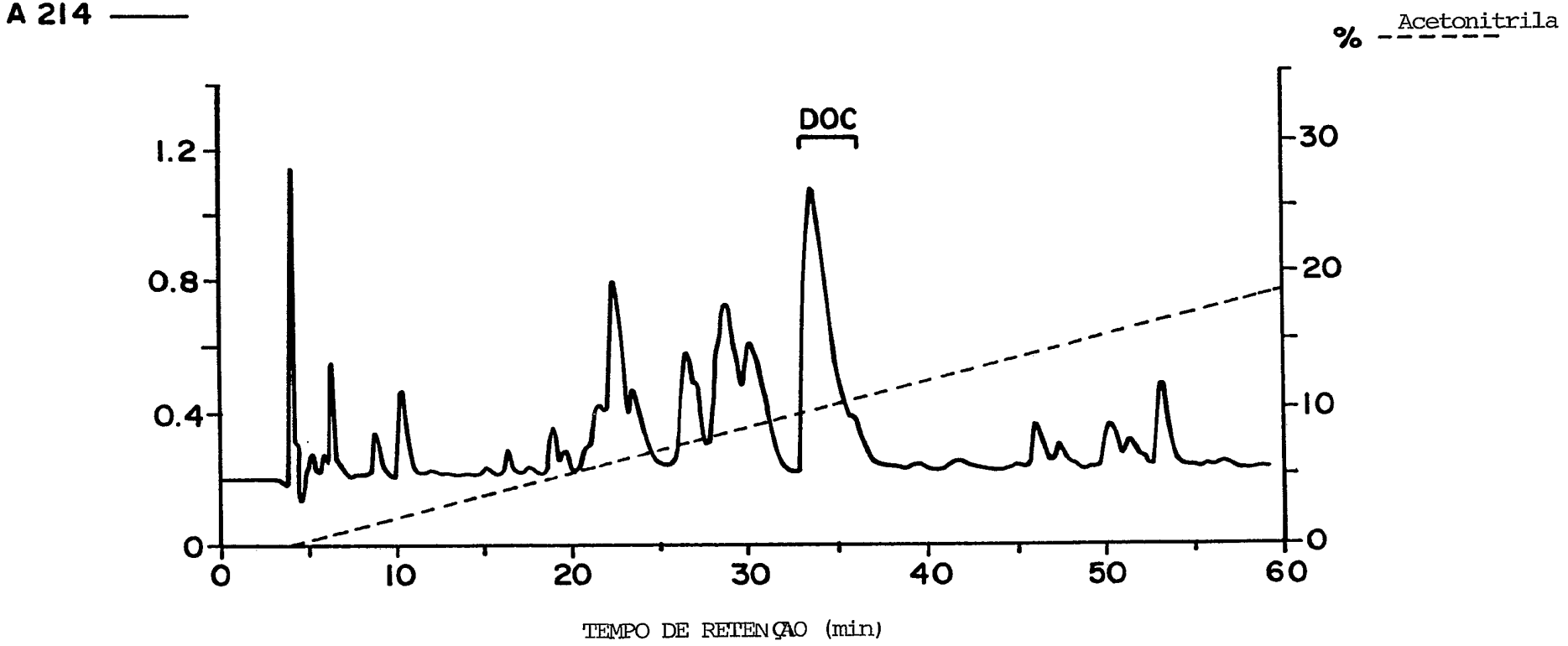


FIG. 4

ESCALA DE PURIFICAÇAO SEMI-PREPARATÓRIA DO DOC1 E DOC3

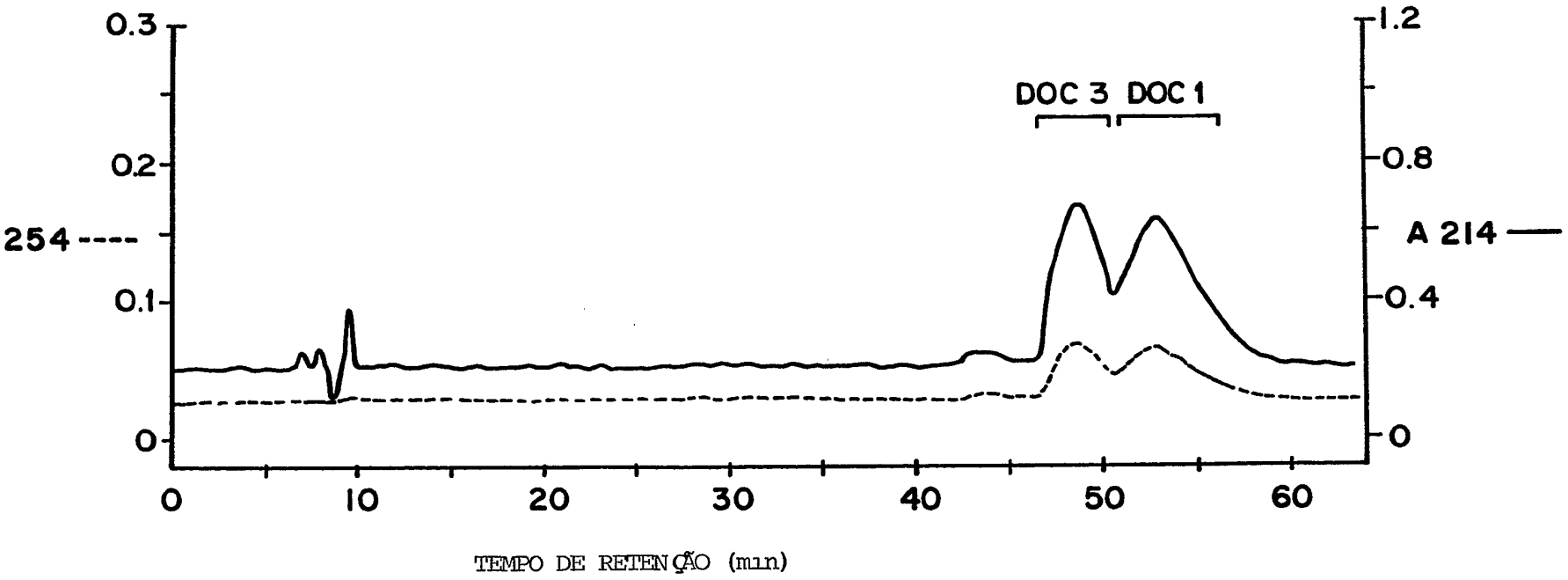


FIG. 5

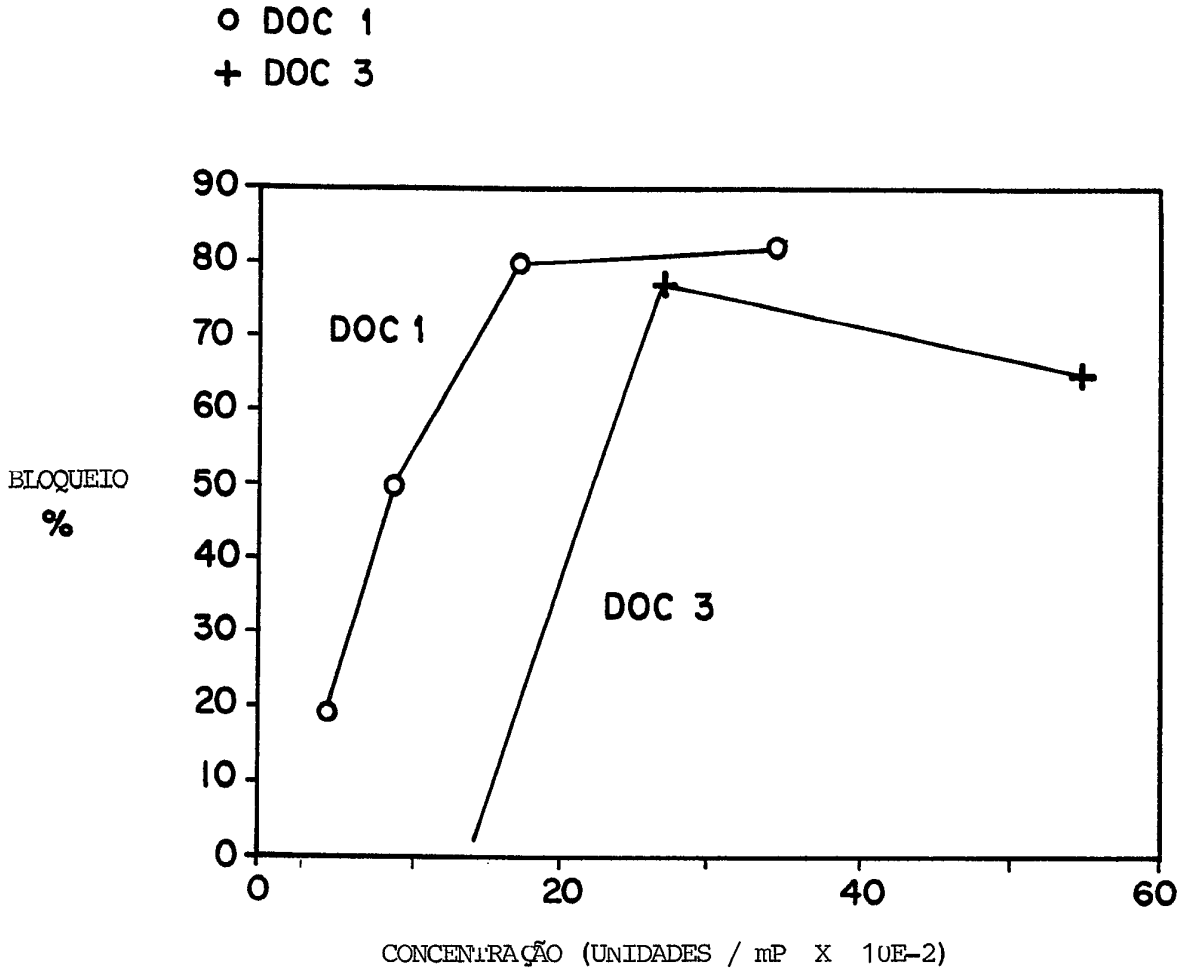

o DOC 1
+ DOC 3
BLOQUEIO
%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DOC 1
DOC 3
0
20
40
60
CONCENTRAÇÃO (UNIDADES / mP X 10E-2)

FIG. 6

AGO. 1992

ESQUEMA - I

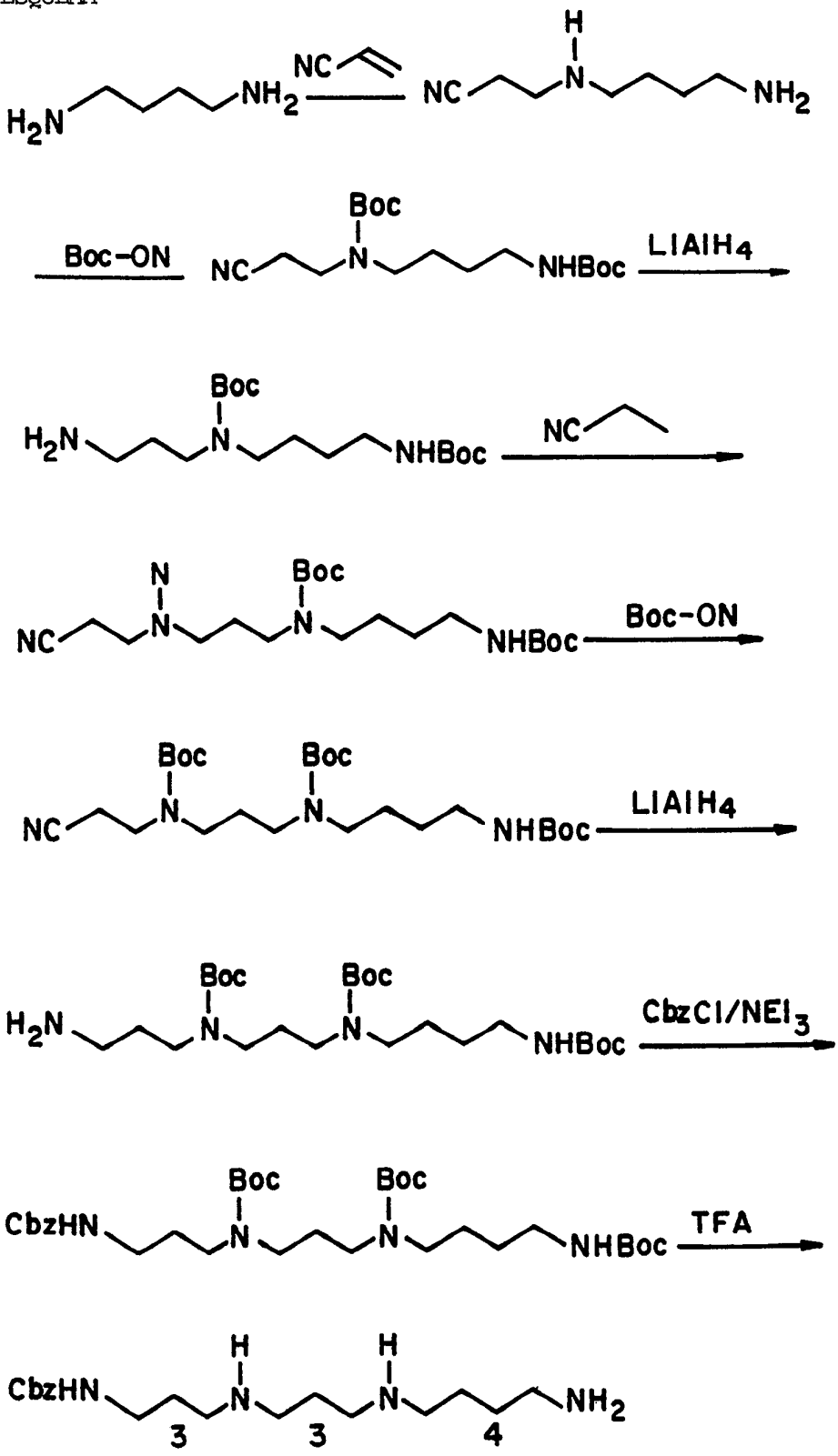


FIG. 7

ESQUEMA -11

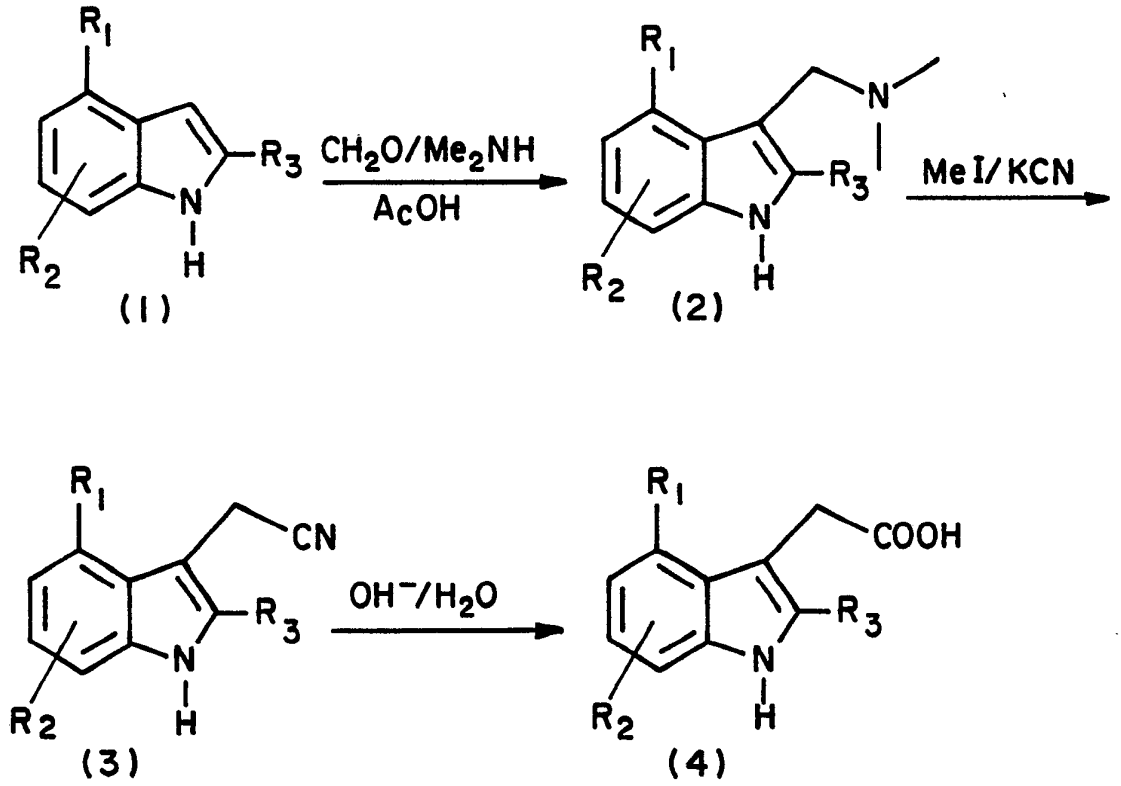


FIG. 8

AGO. 1992

ESQUEMA - III

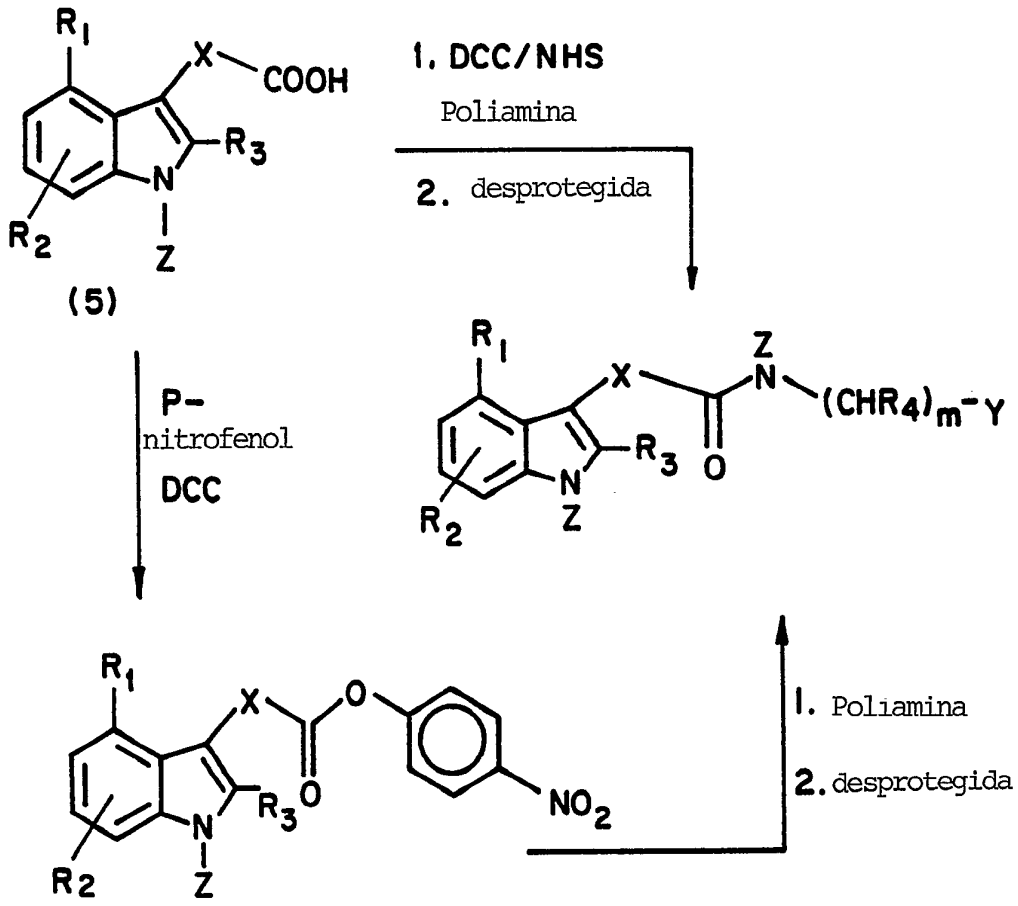


FIG. 9

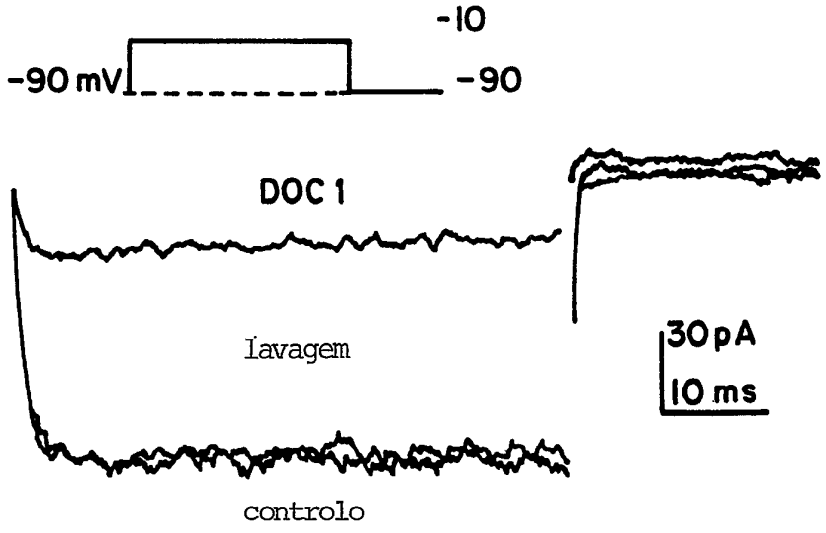


FIG. 10

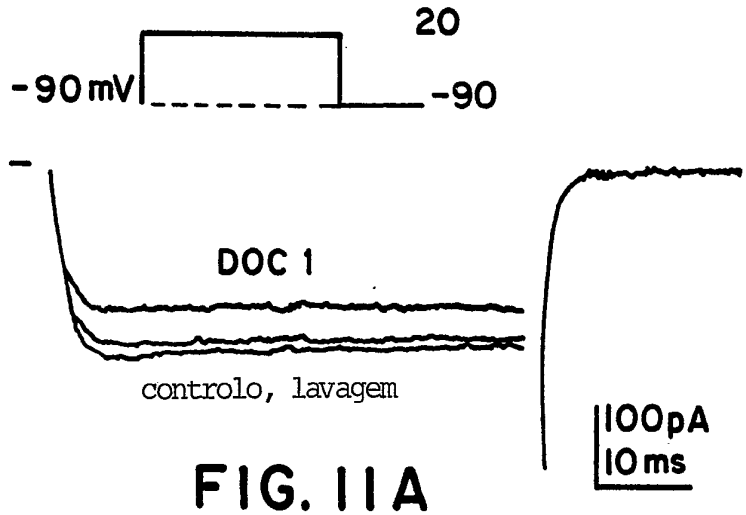


FIG. 11A

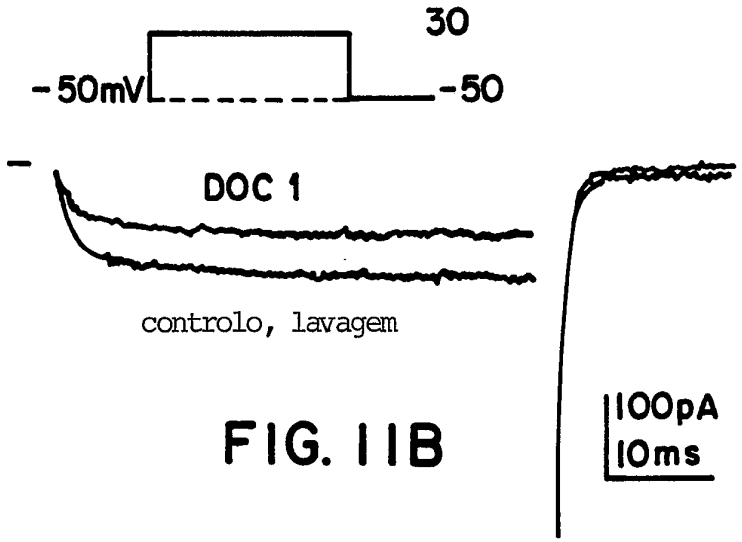


FIG. 11B

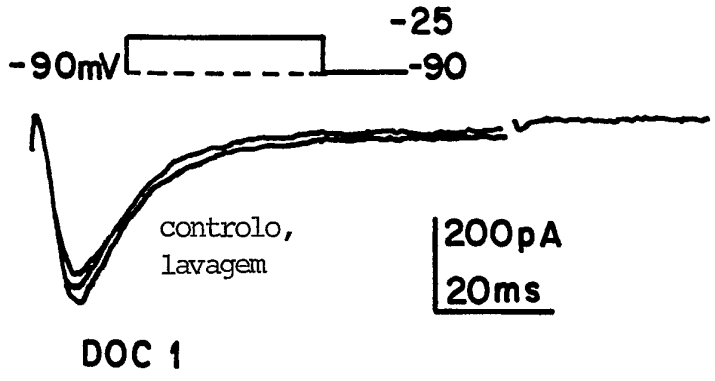


FIG. 11C

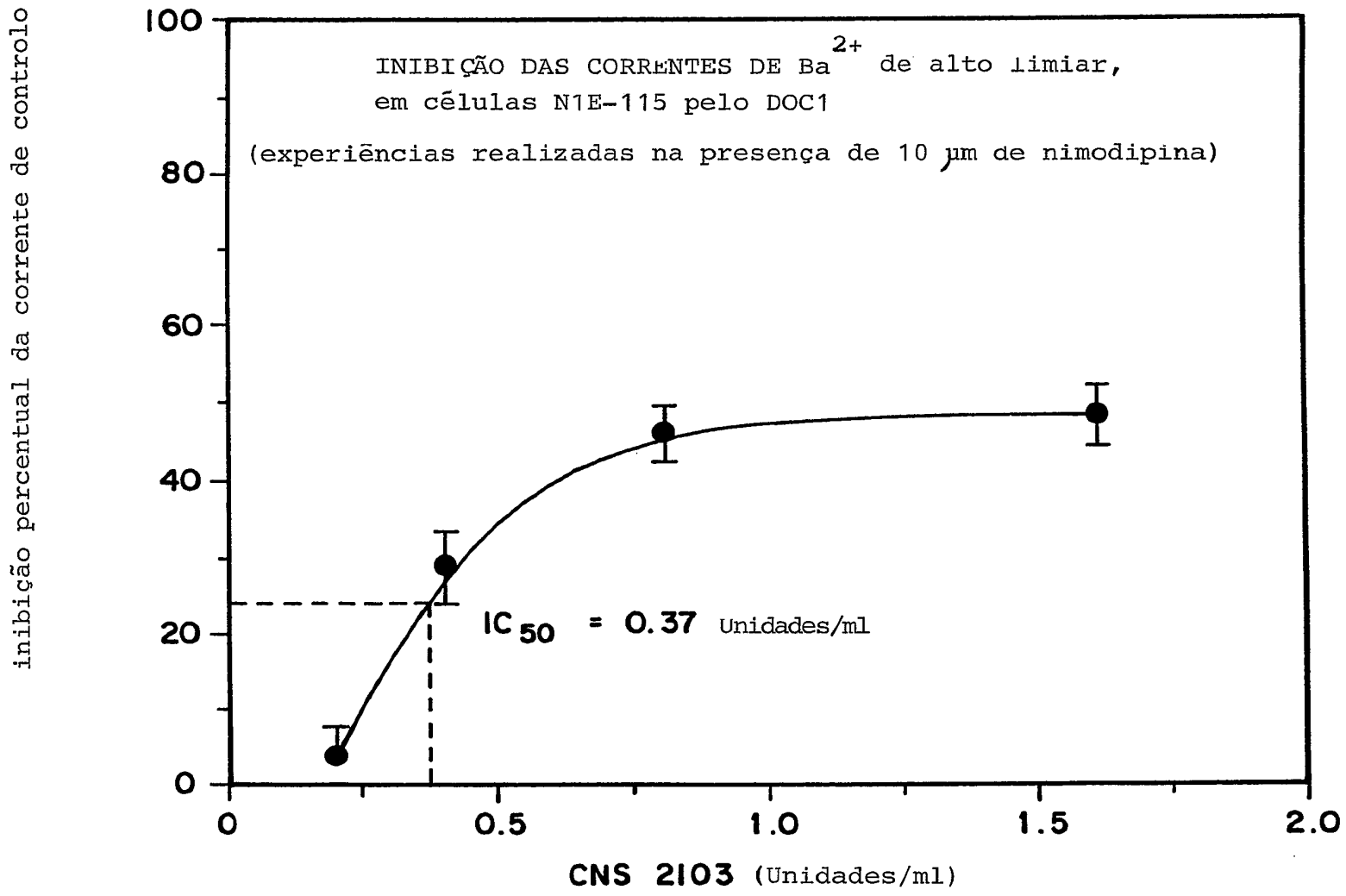

INIBIÇÃO DAS CORRENTES DE Ba2+ de alto limiar,
em células N1E-115 pelo DOC1
(experiências realizadas na presença de 10 µm de nimodipina)
inibição percentual da corrente de controlo
100
80
60
40
20
0
IC50 = 0.37 Unidades/ml
0
0.5
1.0
1.5
2.0
CNS 2103 (Unidades/ml)

FIG. 12

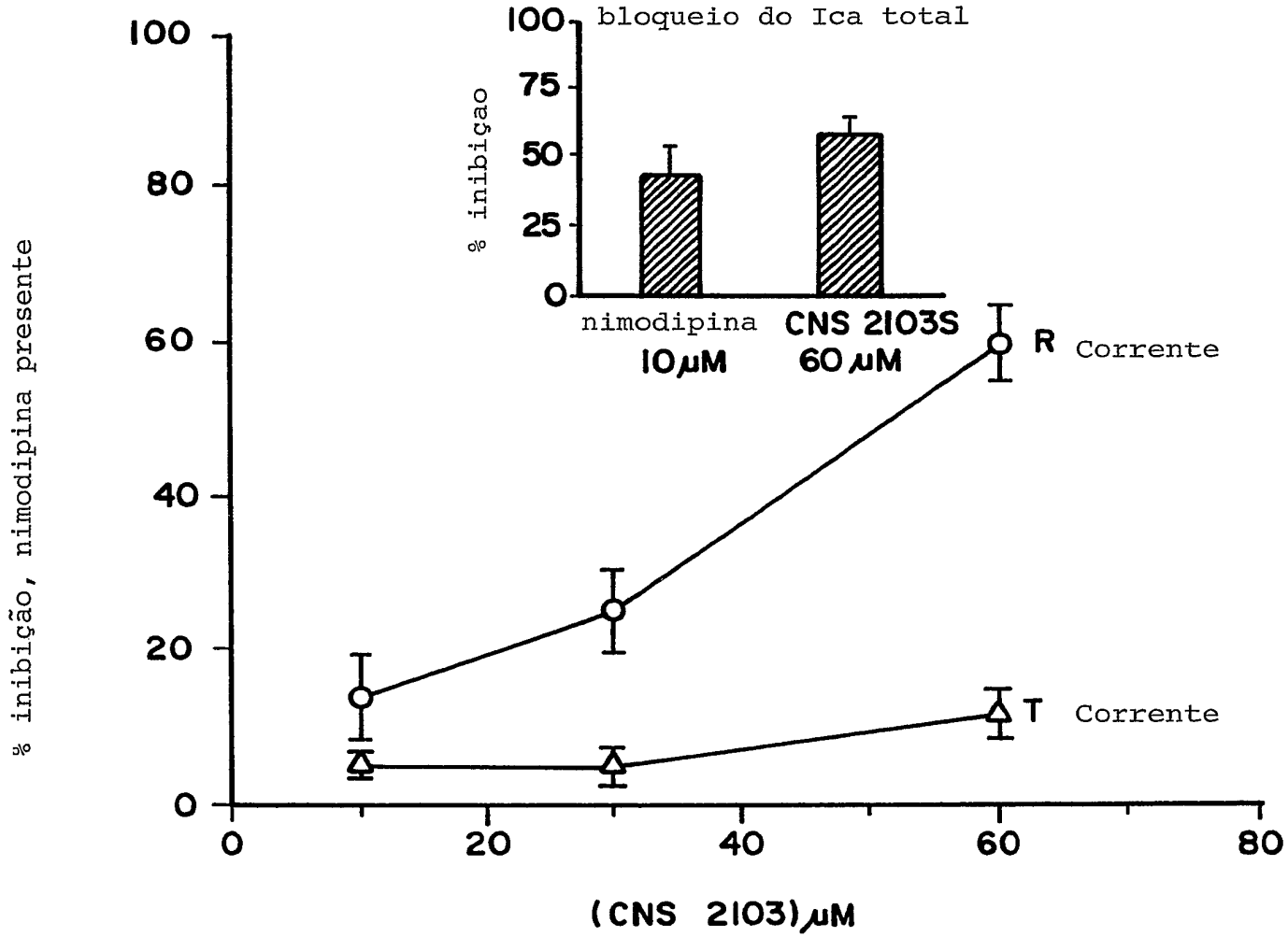

bloqueio do Ica total
% inibiçao
100
75
50
25
0
nimodipina
10μM
CNS 2103S
60μM
% inibição, nimodipina presente
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
R Corrente
T Corrente
(CNS 2103)μM

FIG. 13

CORRENTES DE Ba^{2+} em células N1E-115 tratadas em nimodipina

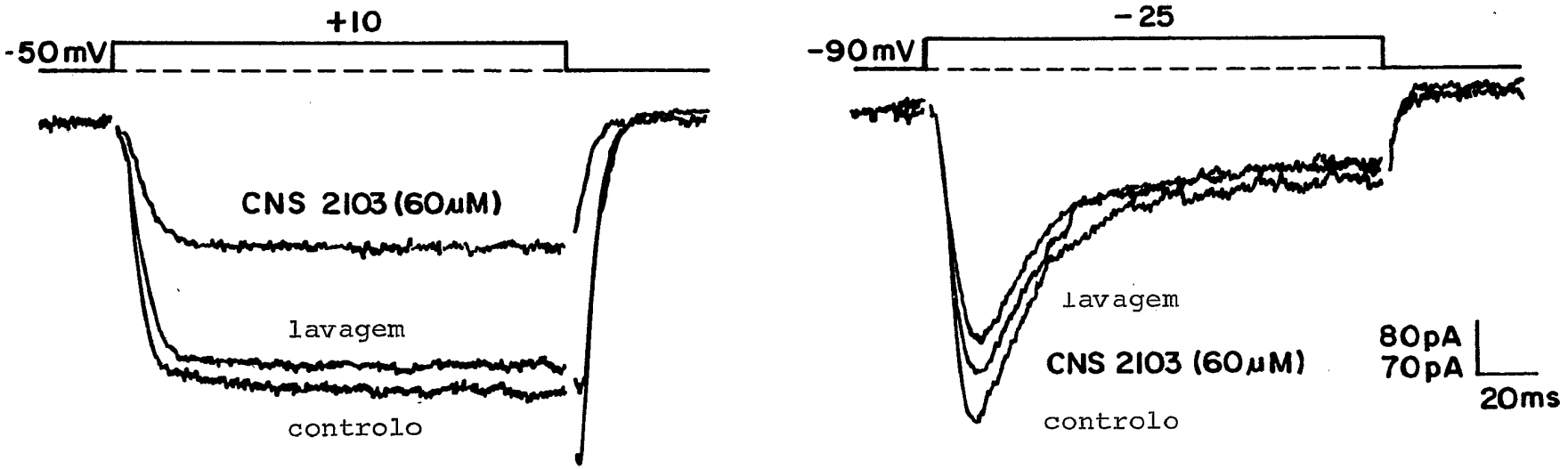


FIG. 14

PERFIL DE MICRORRASTREIO DA ACTIVIDADE ANTAGONISTA DO CANAL DE Ca^{2+} DO TIPO -L

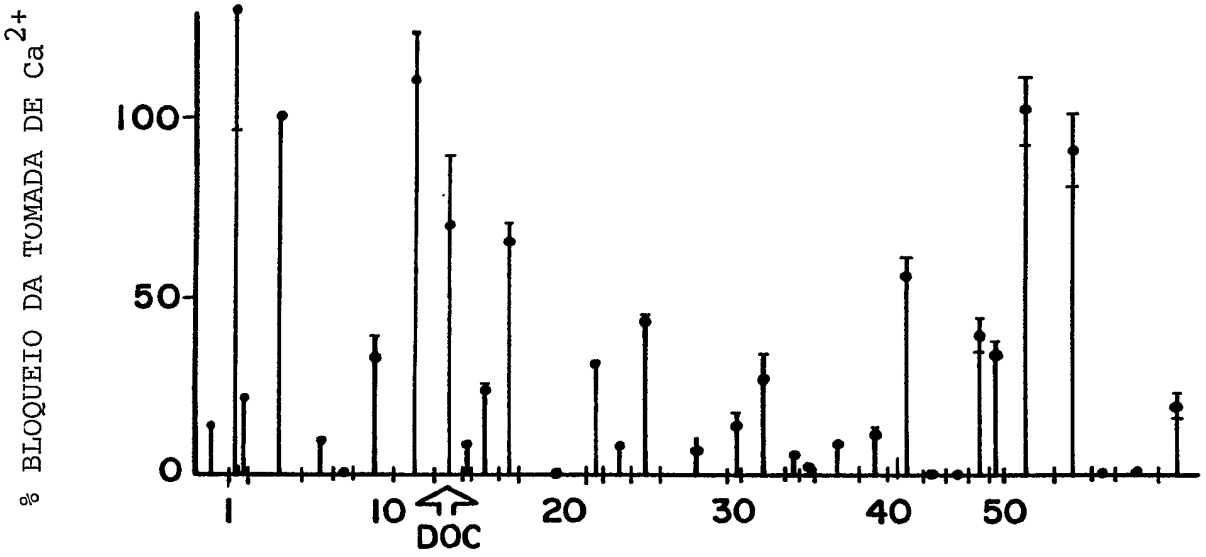


FIG. 15 A

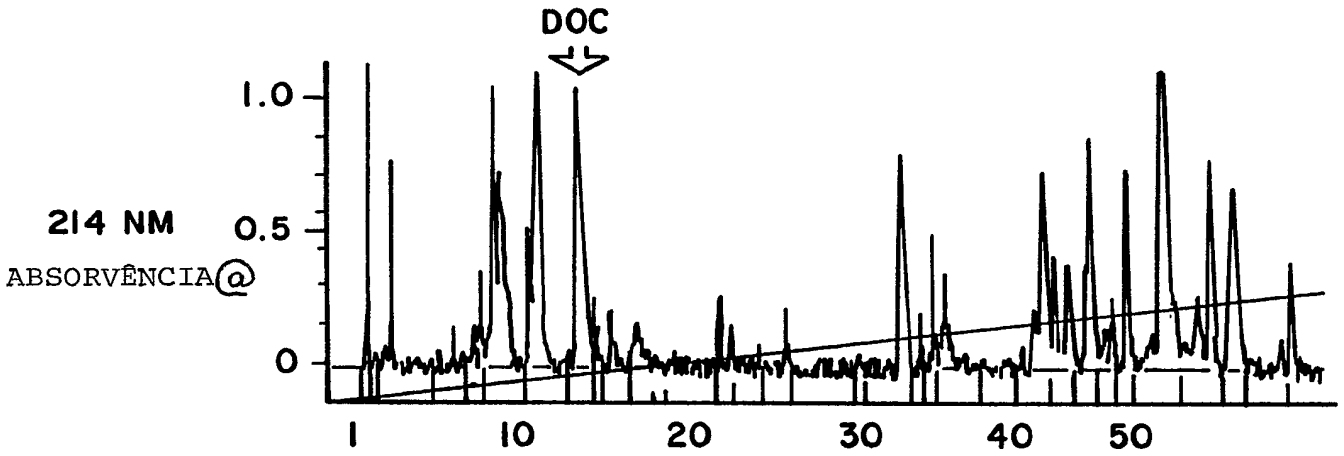


FIG. 15 B

NÚMERO DE FRACÇÃO HPLC DE VENENO DE ARANHA

PERFIL DE MICRORRASTREIO DOS ANTAGONISTAS DO FLUXO DE CÁLCIO SINÁPTICO

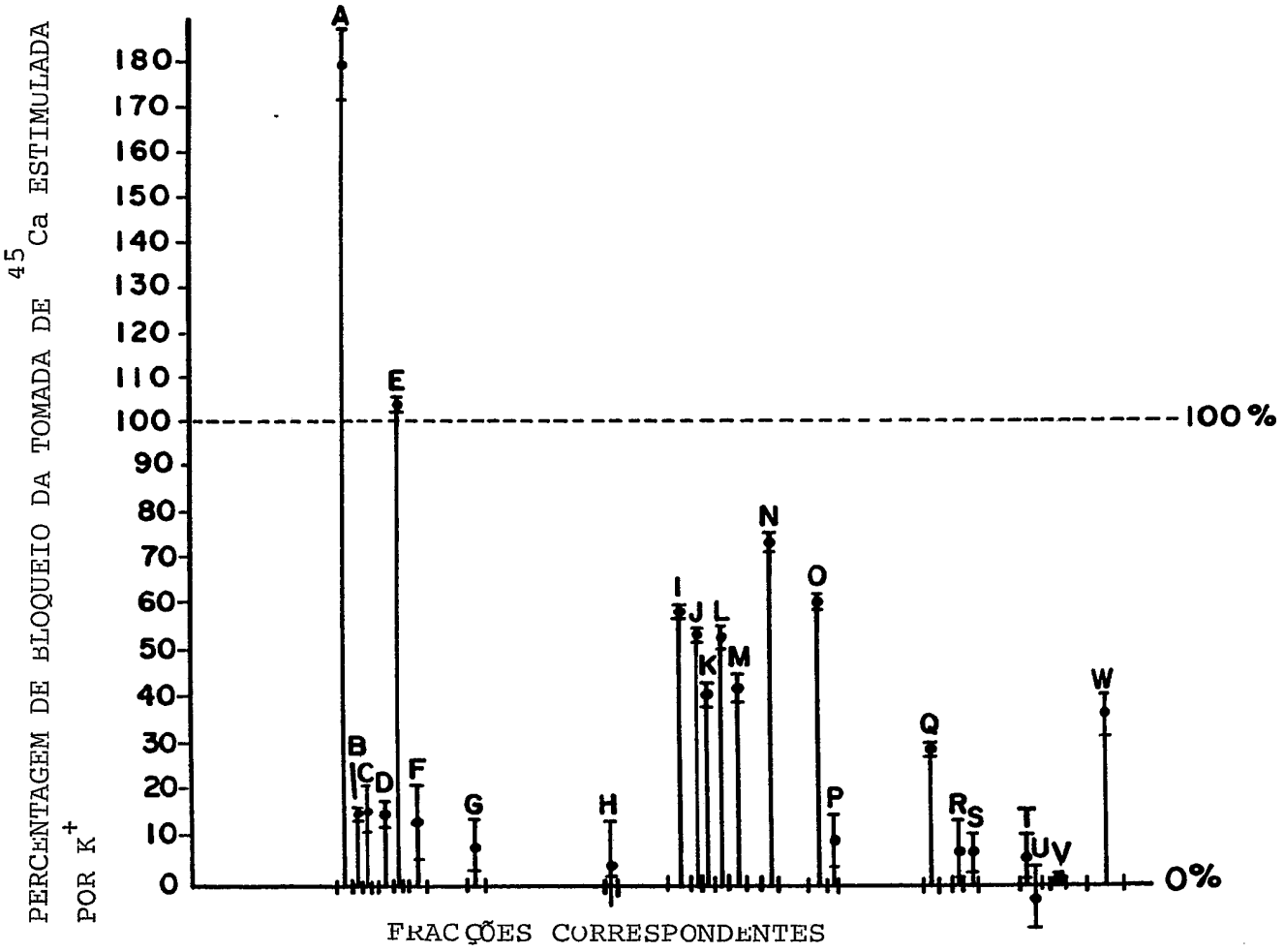


FIG. 16A

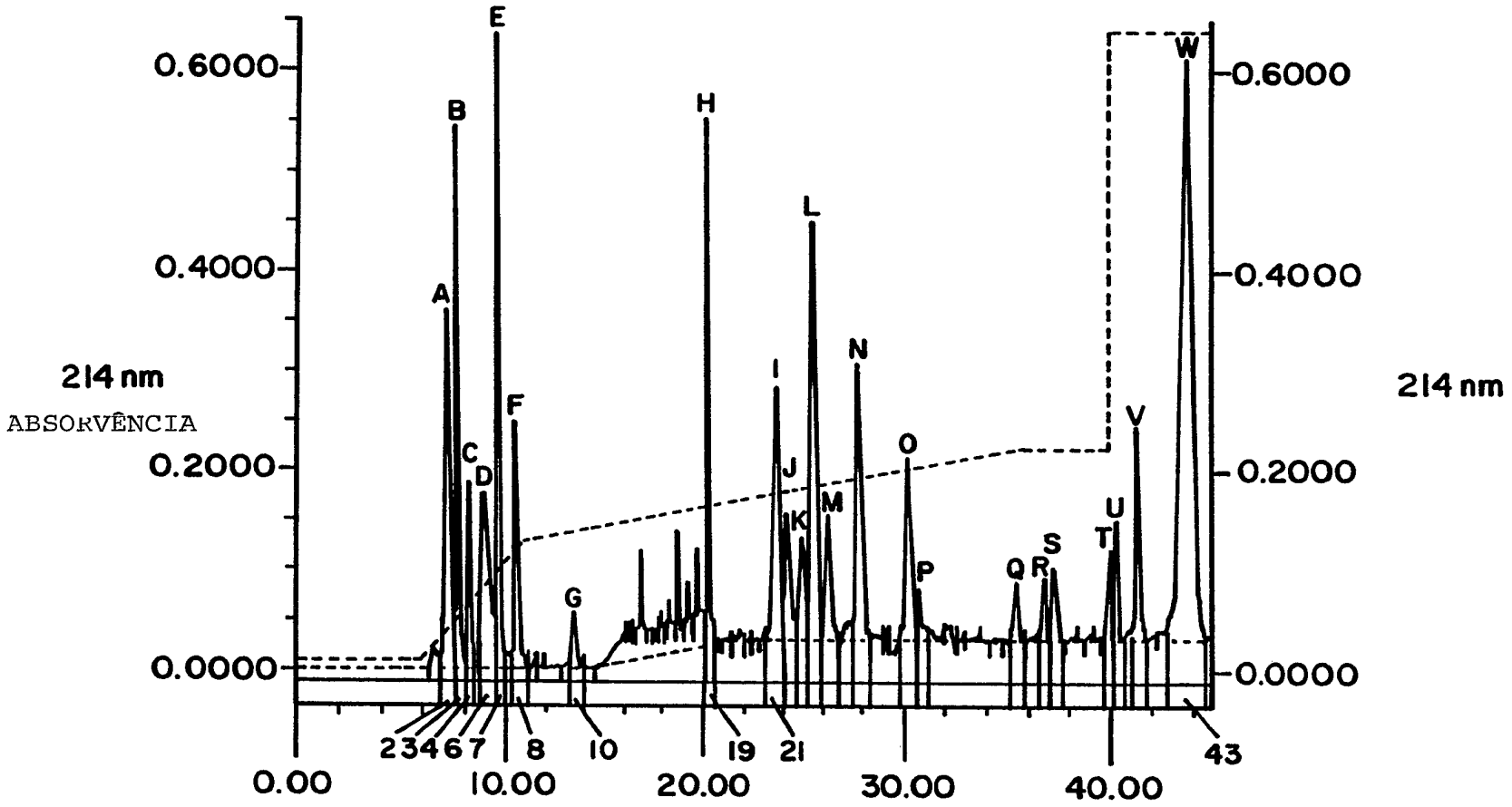

0.6000
0.4000
0.2000
0.0000
214 nm
ABSORVÊNCIA
214 nm
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
2 3 4 6 7 8 10 19 21 43
0.00
10.00
20.00
30.00
40.00
TEMPO DE ELUIÇÃO DE HPLC, MINUTOS

FIG. 16 B

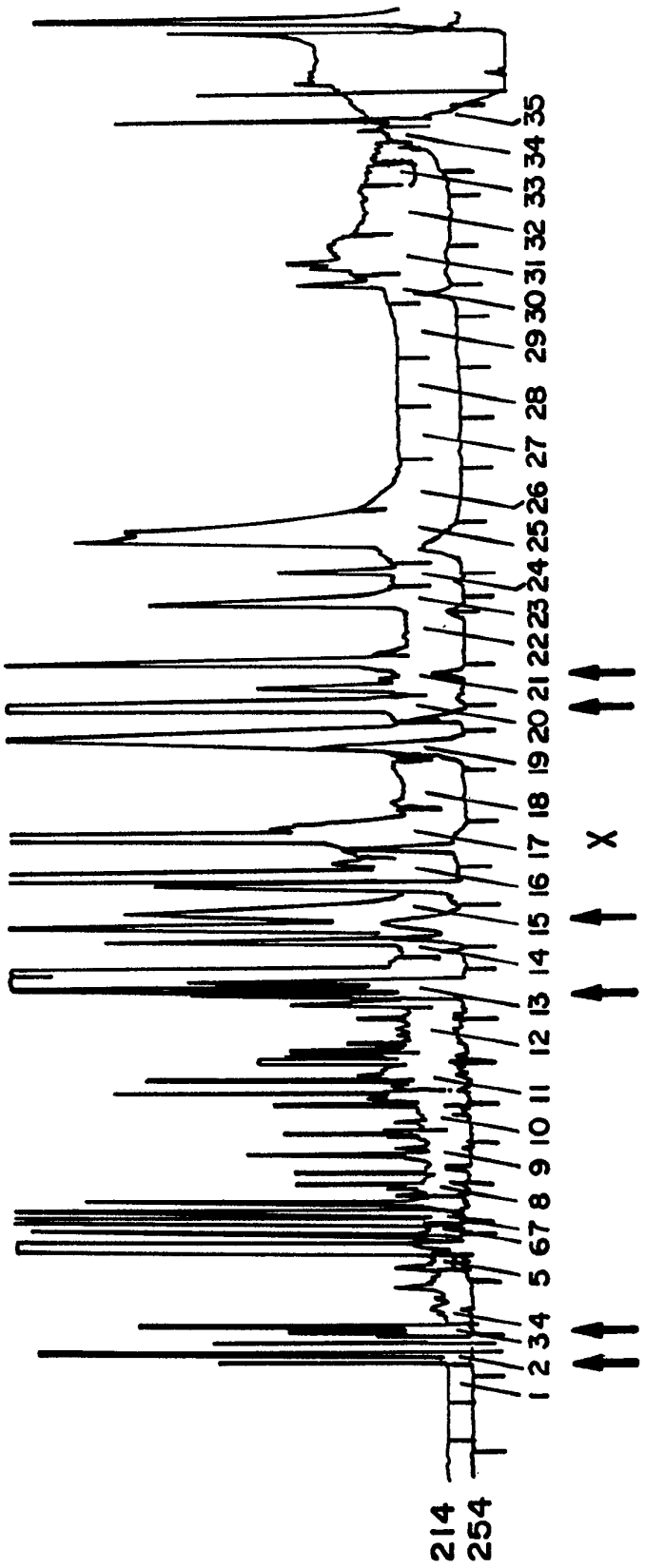

214
254
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
X

FIG. 17