



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

(11) PI 0820749-6 B1



(22) Data do Depósito: 24/11/2008

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: DERIVADOS DE PEPTÍDEO MIMÉTICO DE ERITROPOIETINA E SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DOS REFERIDOS DERIVADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USOS DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 14/505; A61K 47/55; A61K 47/60; A61P 7/06.

(52) CPC: C07K 14/505; A61K 47/55; A61K 47/60.

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2007 CN 2007 10198751.9.

(73) Titular(es): JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD..

(72) Inventor(es): AIFENG LU; CHANGAN SUN; TAO JIANG; WENTAO WU; YALI WANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2008001909 de 24/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/079910 de 02/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/06/2010

(57) Resumo: DERIVADOS DE PEPTÍDEO MIMÉTICO DE ERITROPOIETINA E SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DOS REFERIDOS DERIVADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a um derivado de peptídeo mimético de EPO definido na fórmula (I) e seus sais farmacêuticos, a preparação do mesmo, em que R1, R2, R3, R4, R5, n1, n2 são definidos como descrito na descrição. Uma composição compreendendo um derivado de peptídeo mimético de EPO definido na fórmula (I) e seus sais farmacêuticos. Os usos dos derivados e seus sais farmacêuticos, bem como os usos da composição descrita acima no tratamento de doenças caracterizadas por uma deficiência em EPO ou uma baixa ou defectiva população de células sanguíneas vermelhas. R1-R2-(CH2)n1-R3-(CH2)n2-R4-R5 (I).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"DERIVADOS DE PEPTÍDEO MIMÉTICO DE ERITROPOIETINA E SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DOS REFERIDOS DERIVADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USOS DOS MESMOS".

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a um derivado de peptídeo mimético de eritropoietina (EPO) e seus sais farmacêuticos que se ligam ao receptor de EPO e ativam o receptor de EPO ou têm o efeito agonístico de EPO. Especificamente, a presente invenção refere-se a um derivado de peptídeo mimético de EPO modificado por metóxi poli-etileno glicol ativo e métodos de preparação do mesmo, mas também se refere ao tratamento de distúrbios caracterizados por baixo nível de EPO ou população de células sanguíneas vermelhas defectivas ou insuficientes, utilizando os derivados de peptídeo mimético e seus sais farmacêuticos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] EPO é um hormônio de glicoproteína com um peso molecular de aproximadamente 34 kD. EPO no plasma é composto de 165 aminoácidos com grau elevado de glicosilação, onde o principal componente de glicosila é ácido siálico. Baseado no conteúdo de carboidratos, EPO ocorre naturalmente e é dividida em dois tipos, ou seja, tipo α e β , onde o tipo α contém 34% de carboidrato e o tipo β contém 26% de carboidratos. Estes dois tipos têm as mesmas características biológicas, antigenicidade e efeitos clínicos. O gene EPO humano está localizado no cromossomo 7 de longa Área 22. Seu cDNA foi clonado com sucesso em 1985, e EPO recombinante humana (rHuEPO) têm sido largamente produzida usando a tecnologia de recombinação gênica e amplamente utilizada em procedimentos clínicos. EPO foi biosintetizada usando tecnologia de DNA recombinante (Egrie, JC, Stric-

kland, TW, Lane, J, etc (986) Immunobiology (Immunobiol) 72: 213-224), que é o produto do gene de EPO humana clonado inserido em células do ovário de hamster chinês (células CHO) e expressas no mesmo. EPO humana de ocorrência natural é em primeiro traduzida para cadeias polipeptídicas contendo 166 aminoácidos com a posição 166 sendo arginina. Nas modificações pós-translacionais, arginina na posição 66 é degradada utilizando hidroxil peptidase. O peso molecular de EPO humana sem glicosila é 18236Da. Na molécula de EPO intacta, glicosila representa cerca de 40% do peso molecular total (J.Biol.Chem.262: 12.059).

[0003] EPO é a primeira citocina aplicada em procedimentos clínicos e, de longe, a melhor preparação conhecida de aumento de hemoglobina, com efeitos simples e seguros. Ela tem um certo efeito na anemia renal, anemia aplástica, mieloma múltiplo e hematúria paroxística noturna, além disso, a aplicação de EPO pode reduzir a quantidade de transfusão de sangue em cirurgia e algumas anemias de cura estendida causadas por tumor maligno, quimioterapia e artrite reumatoide. Uma vez que EPO é gerada principalmente por células endoteliais tubulares renais, anemia causada por doença renal é a primeira indicação de EPO, a eficácia curativa de EPO na anemia renal é quase 100%, mas a dose de EPO não melhora a função renal. O tratamento com EPO é seguro, eficaz e adequado para o tratamento de longo prazo e, além disso, ele aborda o problema da escassez do fornecimento de sangue. Nos mercados mundiais de fármacos biotecnológicos em 2006, fármacos recombinantes de EPO representam 11,9 bilhões de dólares norte-americanos. Lá existe uma capacidade enorme de mercado.

[0004] Já em 1989, EPO recombinante humana (EPOGEN) foi aprovada por FDA U.S. para o tratamento da anemia renal, mas é apenas desde 1992, que EPOGEN entrou no mercado chinês. A mor-

bidez anual de nefrite crônica é de cerca de 0,25% na China, dos quais uma proporção considerável de pacientes eventualmente desenvolvem insuficiência renal. O número de pacientes com anemia renal é de cerca de 500-600 mil a cada ano. Segundo estimativas conservadoras de consumo, juntamente com o consumo em outras anemias relacionadas com câncer, a capacidade do mercado interno é de cerca de 1,2-1,6 bilhões ou mais (calculado com o preço atual que está sendo 30-40 CNY / dose, o peso médio dos pacientes sendo 50 kg). Desde o final dos anos 90, EPO foi classificada como best-seller de fármacos nas grandes cidades da China. A quantidade de consumo é 62.13 milhões de yuan nos hospitais modelos de todas as grandes cidades da China, em 2003, classificação Nº 56. A despesa com EPO nos hospitais modelos das grandes cidades por toda a China subiu para 80.490 milhões CNY em 2004, com aumento de ano em ano de 30%.

[0005] Como um hormônio endógeno agindo em células hematopoiéticas da medula para promover a proliferação, diferenciação e maturação final de células progenitoras eritroides, EPO desempenha um papel importante na regulação do estado de oxigênio do corpo. Na fase de embrião, EPO é produzida pelo fígado e depois gradualmente desloca-se para os rins. EPO é principalmente secretada pelas células tubulares intersticiais renais após o nascimento.

[0006] Durante a indução de diferenciação de células progenitoras vermelhas por EPO, a globulina é induzida, o que permite às células recrutar mais hemoglobina com função de sintetizar ferro, o que pode combinar com o oxigênio na maturação de glóbulos vermelhos; portanto, glóbulos vermelhos e hemoglobina desempenham um papel importante no fornecimento de oxigênio para o corpo. Este curso é causado pela interação entre EPO e receptor de superfície das células progenitoras vermelhas.

[0007] Quando o corpo está em um estado saudável, o tecido po-

de obter oxigênio suficiente a partir de já existentes células sanguíneas vermelhas. Neste momento a concentração de EPO no corpo é muito baixa. Essa baixa concentração de EPO, mas normal, é suficiente para estimular a promoção da geração de células sanguíneas vermelhas, que normalmente é perdida durante o envelhecimento.

[0008] Quando o nível de transporte de oxigênio pelas células sanguíneas vermelhas no sistema de circulação é reduzido e hipoxia aparece, a quantidade de EPO no organismo vai aumentar. O estado de hipoxia no corpo pode ser causado pelas seguintes razões: radiação excessiva, redução do consumo de oxigênio devido à latitude alta ou coma a longo prazo, vários tipos de anemia e assim por diante. Em resposta ao estresse de hipoxia do corpo, um maior nível de EPO pode estimular a diferenciação de células progenitoras vermelhas para melhorar a sua capacidade de produzir glóbulos vermelhos. Quando o número de glóbulos vermelhos no corpo excede a necessidade do tecido normal, o nível de EPO no sistema de circulação é reduzido. Isto se dá precisamente porque EPO tem um papel crucial para a formação de células sanguíneas vermelhas que estes hormônios têm uma perspectiva muito ampla para o tratamento e diagnóstico de doenças do sangue caracterizadas pela geração baixa e defeito de glóbulos vermelhos. Estudos recentes fornecem a base para prever o efeito da terapia de EPO em uma variedade de doenças, distúrbios e anormalidades hematológicas, estas doenças, incluindo: o uso de EPO no tratamento da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), e administração de EPO em pacientes com AIDS e recebendo quimioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, EPO in Clinical Applications-An International Perspective. Marcel Dekker, 1990: P301-324).

[0009] Parte dos efeitos biológicos de EPO pode ser regulada pelo papel interno de receptores de superfície da membrana celular. Anteriormente, quando ao estudar ligação de proteína de EPO para superfí-

cie celular utilizando células sanguíneas vermelhas imaturas isoladas do baço de camundongos, verifica-se que esta proteína é composta por dois polipeptídeos, e seu peso molecular é de aproximadamente 85.000 ~ 100000KD (ver Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694 para uma descrição mais detalhada). O número de sítios de ligação de EPO também tem sido calculado. Cada membrana celular contém cerca de 8-100 sítios. Nestes sítios de ligação, cerca de 300 sítios de ligação têm um nível de Kd de 90pM. A ligação dos sítios de ligação restantes é fraca, sendo cerca de 570pM. Alguns estudos têm demonstrado que, a partir da resposta à EPO de glóbulos vermelhos do baço de camundongos infectados com a cepa de anemia de vírus atenuado, cerca de 400 sítios de ligação são identificados, em que alguns têm um nível elevado de Kd de 100pM e alguns têm um baixo nível Kd de 800pM.

[00010] O trabalho subsequente é que dois tipos de receptor de EPO são transcritos por um único gene. O gene foi clonado agora. Por exemplo, as sequências de DNA e sequências de decodificação de peptídeos do camundongo e receptor de EPO humana foram descritas em WO90/08822. O modelo atual mostra que a ligação de EPO ao receptor de EPO leva à ativação e dimerização de dois receptores de EPO. Esta dimerização leva ainda ao início da sinalização.

[00011] A aplicação do gene clonado de EPO é útil na busca de agonistas e antagonistas desses receptores importantes. O peptídeo que pode, em certa medida, atuar sobre os receptores de EPO foi identificado e descrito. Especialmente, um grupo de peptídeos contendo o fragmento principal de peptídeo foi identificado, o que pode ligar ao receptor de EPO e estimular a diferenciação e proliferação das células de EPO. No entanto, a EC50 do peptídeo que pode estimular a diferenciação e proliferação das células de EPO é muito baixa, variando de 20nM a 250nM. Portanto, as aplicações clínicas desses peptí-

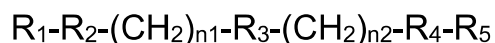
deos são muito limitadas. A fim de superar as deficiências das tecnologias existentes, a presente invenção fornece derivados de peptídeo mimético de EPO com maior atividade biológica e uma maior biodisponibilidade, bem como seus sais farmacêuticos e seu método de preparação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[00012] A presente invenção visa proporcionar um derivado de peptídeo mimético de EPO com melhor atividade biológica e biodisponibilidade mais elevada, bem como seus sais farmacêuticos e seu método de preparação.

[00013] A invenção também visa fornecer uma composição farmacêutica compreendendo o referido derivado de peptídeo mimético de EPO e seus sais farmacêuticos, para o tratamento de distúrbios caracterizados por baixo nível de EPO ou população de células sanguíneas vermelhas insuficientes ou defectivas.

[00014] A invenção divulga um derivado de peptídeo mimético de EPO da fórmula geral (I) e seus sais farmacêuticos com a atividade biológica in vivo,



(I)

[00015] em que R_1 , R_5 são selecionados a partir do peptídeo de monômero peptídeo mimético de EPO e seus análogos com a atividade biológica in vivo; n_1 , n_2 são números inteiros, independentemente selecionados de 0 a 10; R_2 , R_4 são selecionados a partir de $-CO$ ou $-CH_2$, R_3 é selecionado a partir O , S , CH_2 , $N(CH_2)_{n_3}NHR_6$, $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, $CHOCONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, $CHSCON(CH_2)_{n_5}NHR_6$ ou $CHNHCON(CH_2)_{n_5}NHR_6$; em que n_3 é um número inteiro selecionado a partir de 1 a 10, n_4 é um número inteiro selecionado a partir de 2 a 10, n_5 é um número inteiro selecionado de 2 a 10, R_6 é selecionado a partir de H ou derivados de metóxi polietileno glicol.

[00016] Nesse aspecto, uma modalidade preferida é: R₁, R₅ são independentemente selecionados a partir de peptídeo de monômero de peptídeo mimético de EPO e seus análogos de fórmula geral Y₁X₁X₂X₃GX₄X₅TWX₆X₇Y₂Y₃, que têm na atividade biológica in vivo, em que cada aminoácido é designado por uma única letra padrão, as sequências de aminoácidos de R₁, R₅ podem ser consistentes ou inconsistentes, e sequências de aminoácidos adicionalmente preferidas de R₁, R₅ são consistentes, e N-terminal de R₁, R₅ é acetilizado; X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, Y₃ são independentemente selecionados a partir de qualquer um dos 20 L-aminoácidos geneticamente codificados ou aminoácidos não-naturais, Y₁, Y₂ são independentemente selecionados a partir de qualquer um dos 20 L-aminoácidos geneticamente codificados ou aminoácidos não-naturais ou peptídeos formados por estes aminoácidos, X₁, X₇ são selecionados a partir de C, K, D, E, Orn ou Hoc.

[00017] Além disso otimizar a modalidade preferida acima referida, R₁, R₅ são peptídeos cíclicos ciclizados por ligações de dissulfeto ou ligações de amida, onde se R₁, R₅ são peptídeos cíclicos ciclizados por ligações de dissulfeto, X₁, X₇ são independentemente selecionados a partir de C ou Hoc, da mesma forma, se R₁, R₅ são peptídeos cíclicos ciclizados por ligações de amida, X₁, X₇ são independentemente selecionados a partir de K, D, E ou Orn.

[00018] No aspecto envolvendo a modalidade preferida acima referida, Y₃ é de preferência selecionado a partir de K, H ou R, mais preferivelmente Y₃ é K.

[00019] No aspecto envolvendo a modalidade preferida acima referida, o comprimento da sequência de aminoácidos de R₁, R₅ é ainda mais otimizado, ou seja, de preferência, selecionado a partir de 13 ~ 40 aminoácidos, mais preferivelmente sendo 22 aminoácidos, ainda mais preferivelmente, mas não se limitando à seguinte estrutura com um peptídeo cíclico, mais preferivelmente, mas não limitado a NO: 1 ~

NO: 8 peptídeos cíclicos, a saber

Ac-GGLYADHYGPITWVKQPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:1)
 Ac-GGLYADHYGPITWV-Orn-QPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:2)
 Ac-GGLYAKHYGPITWVDQPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:3)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPITWVDQPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:4)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:5)
 Ac-GGTYS-*N*le-FGPLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:6)
 Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:7)
 Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:8)
 Ac-GGLYADHYGPMTWVKQPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:9)
 Ac-GGLYADHYGPMTWV-Orn-QPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:10)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPMTWVDQPLRGK-NH₂(SEQ ID NO:11)
 Ac-GGTYSKHFGPMTWVDRPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:12)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:13)
 Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:14)
 Ac-GGTYSCHFGPITWV-Hoc-RPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:15)
 Ac-GGTYS-*N*le-FGPMTWV-Hoc-RPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:16)
 Ac-GGTYS-*N*le-FGPITWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:17)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:18)
 Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:19)
 Ac-GGTYSKHFGSMTWVERPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:20)
 Ac-GGTYRCSMGPMTWVCLPMAGGK-NH₂(SEQ ID NO:21)
 Ac-GGTYRCSMGPLTWVCLPMAGGK-NH₂(SEQ ID NO:22)
 Ac-GGTYSCHFGAMTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:23)
 Ac-GGTYSCHFGAITWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:24)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:25)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:26)
 Ac-GGMYSCRMGPMTWVCGPSRGGK-NH₂(SEQ ID NO:27)
 Ac-GGMYSCRMGPLTWVCGPSRGGK-NH₂(SEQ ID NO:28)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWV-Hoc-RPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:29)或
 Ac-GGTYS-Hoc-HFGPLTWVCRPQRG-β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:30)

[00020] Neste aspecto, existem quatro modalidades preferidas:

[00021] 1 n_1, n_2 são 2, R_2, R_4 são -CO, R_3 é $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, n_5 é 2, R_6 é H ou derivados de metóxi polietileno glicol.

[00022] 2 n_1, n_2 são 1, R_2, R_4 são -CO, R_3 é $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, n_4 é 2, R_6 é H ou derivados de metóxi polietileno glicol.

[00023] 3 n_1, n_2 são 2, R_2, R_4 são -CH₂, R_3 é

CHOCONH(CH₂)_{n5}NHR₆, n₅ é 2, R₆ é H ou derivados de metóxi polietileno glicol.

[00024] 4 n₁, n₂ são 1, R₂, R₄ são -CH₂, R₃ é NCO(CH₂)_{n4}NHR₆, n₄ é 2, R₆ é H ou derivados de metóxi polietileno glicol.

[00025] As quatro modalidades preferidas acima mencionadas estão em paralelo, não sendo relação progressiva ou inclusiva.

[00026] As quatro modalidades preferidas acima mencionadas podem ser adicionalmente otimizadas, R₆ é derivados de metóxi polietileno glicol, mais preferivelmente R₆ é derivados de metóxi polietileno glicol, onde o peso molecular de derivados de metóxi polietileno glicol é de 5.000 a 100.000 Dáltons, a estrutura de derivados de metóxi polietileno glicol é selecionada a partir do tipo ramificado ou linear.

[00027] Neste aspecto, através da otimização adicionalmente compreensiva pode-se obter as seguintes quatro modalidades preferidas:

[00028] 1 n₁, n₂ são 2, R₁, R₅ são selecionados a partir de SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 8, R₂, R₄ são selecionados a partir de -CO, -CH₂, R₃ é CHOCONH (CH₂)_{n5}NHR₆, onde n₅ é selecionado a partir de 2 a 10, de preferência 2, R₆ é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 20.000 dáltons.

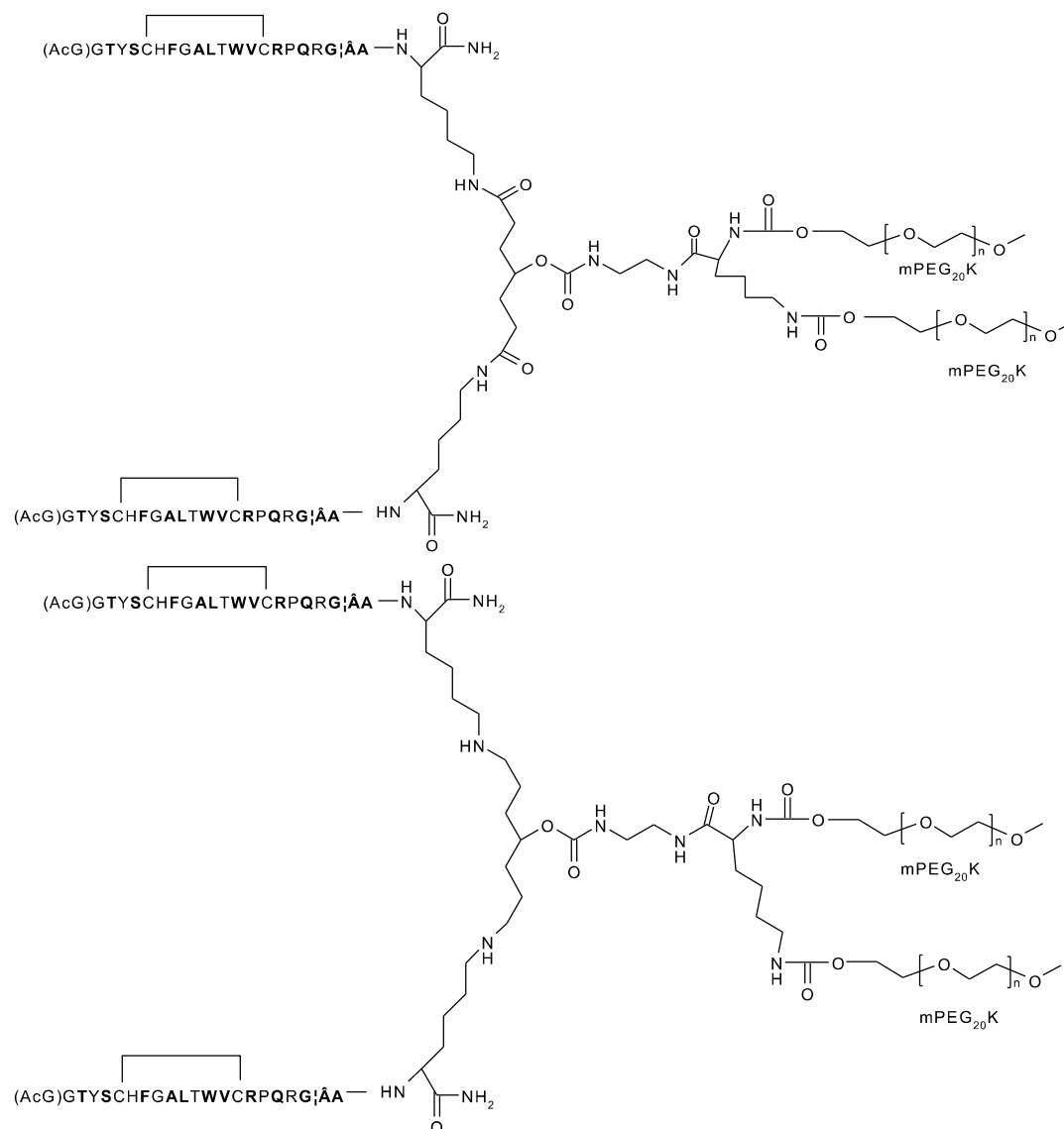
[00029] 2 n₁, n₂ são 1, R₁, R₅ são selecionados a partir de SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 8, R₂, R₄ são selecionados a partir de -CO, -CH₂, R₃ é NCO(CH₂)_{n4}NHR₆, onde n₄ é selecionado a partir de 2 a 10 e, de preferência 2, R₆ é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 20.000 dáltons.

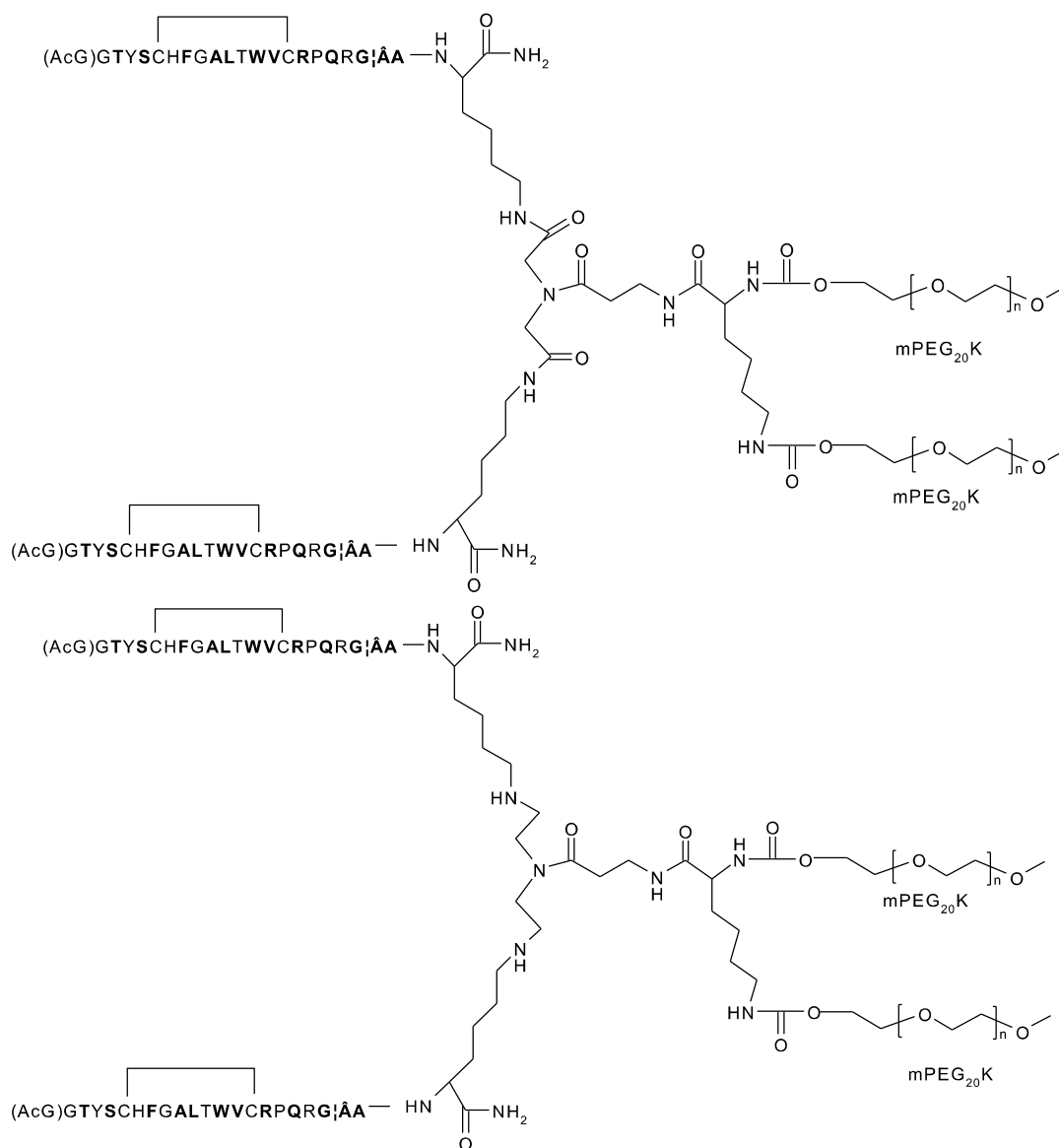
[00030] 3 n₁, n₂ são 2, R₁, R₅ são selecionados a partir de SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 8, R₂, R₄ são selecionados a partir de -CO, -CH₂, R₃ é CHOCONH(CH₂)_{n5}NHR₆, onde n₅ é selecionado a partir de 2 a 10 e, de preferência 2, R₆ é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 40.000 dáltons.

[00031] 4 n₁, n₂ são 1, R₁, R₅ são selecionados a partir de SEQ ID

NO: 1 SEQ ID NO: 8, R₂, R₄ são selecionados a partir de -CO, -CH₂, R₃ é NCO(CH₂)_{n4}NHR₆, onde n₄ é selecionado a partir de 2 a 10 e, de preferência 2, R₆ é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 40.000 dáltons.

[00032] A estrutura dos derivados de peptídeo mimético de EPO mais preferida e seus sais farmacêuticos é selecionada a partir de:





[00033] Os derivados de peptídeos mimético de EPO fornecidos aqui são compostos anfifílicos, que podem formar sais por reação com compostos ácidos ou alcalinos através de tecnologia comumente conhecida por um versado na técnica. Ácidos comumente utilizados são selecionados a partir do ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido iodídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenossulfônico, ácido metanossulfônico, ácido oxálico, p-bromofenila de ácido sulfônico, ácido carbônico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, sais formados incluindo sulfato, pirofosfato, triflutato, sulfito, bis-sulfito, fosfato, bifosfato, di-hidricfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloreto, brometo, iodeto, acetato, propionato, caprilato, acrilato, formiato,

isobutirato caproato, enantato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, fumarato, maleato de butina-1,4-dioato, hexina-1,6-dioato, benzoato, benzoato de cloro, benzoato de metila, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, fenilacetato, fenpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, γ -hidroxibutirato glicolato, tartarato, metanossulfonato, propilsulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato mandelato, e similares, de preferência triflutato.

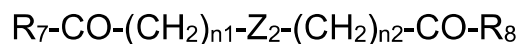
[00034] Substâncias alcalinas também podem reagir com derivados de peptídeo mimético de EPO para gerar sais. Estas substâncias alcalinas são selecionadas a partir de amônio, hidróxidos de metal alcalino ou metal alcalinoterroso, bem como o carbonato, bicarbonato, tipicamente selecionados a partir de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, carbonato de sódio, carbonato de potássio e assim por diante.

[00035] A invenção também divulga os programas de preparação dos derivados de peptídeo mimético de EPO acima mencionados e seus sais farmacêuticos, incluindo as seguintes etapas:

(1) preparar R_1 , R_5 através da engenharia genética ou método de síntese química. R_1 , R_5 são peptídeo mimético de peptídeo de monômero e seus análogos com a função biológica do EPO;

(2) preparar pequena molécula funcional de fórmula geral

(II)



(II)

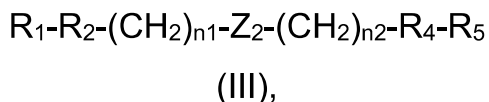
[00036] em que n_1 , n_2 são números inteiros independentemente selecionados a partir de 0 a 10;

[00037] R_7 , R_8 são selecionados a partir OH ou H;

[00038] Z_2 é selecionado a partir de O, S, CH_2 , $\text{N(CH}_2\text{)}_{n_6}\text{NHR}_9$, $\text{NCO(CH}_2\text{)}_{n_7}\text{NHR}_9$, $\text{CHOCONH(CH}_2\text{)}_{n_8}\text{NHR}_9$, $\text{CHSCON(CH}_2\text{)}_{n_8}\text{NHR}_9$ ou $\text{CHNHCON(CH}_2\text{)}_{n_8}\text{NHR}_9$, onde n_6 é um número inteiro selecionado a

partir de 1 a 10, n_7 é um número inteiro selecionado de 2 a 10 n_8 é um número inteiro selecionado a partir de 2 a 10, R_9 é selecionado a partir Boc ou CB_Z ,

(3) derivar R_1 , R_5 , com pequena molécula funcional de fórmula (II), para preparar o composto de fórmula (III);



[00039] em que R_2 , R_4 são independentemente selecionados a partir de $-CO$ ou $-CH_2$,

(4) conectar com metóxi polietileno glicol ativo via ligações covalentes após Boc ou Cb_Z ser removido.

[00040] A invenção também se refere a uma composição farmacêutica, compreendendo:

(1) quantidades terapêuticas dos derivados de peptídeo mimético de EPO acima mencionados e seus sais farmacêuticos da fórmula geral (I);

(2) veículo de fármaco farmaceuticamente aceitável.

[00041] A invenção também revela o uso de fármacos, ou seja, utilizando qualquer desses derivados de peptídeos miméticos e seus sais farmacêuticos em quantidades terapêuticamente eficazes para tratar distúrbios caracterizados por baixo nível de EPO ou grupo de células sanguíneas vermelhas defeituosas ou insuficientes, especialmente para o tratamento das seguintes doenças: insuficiência renal avançada ou diálise, anemia relacionada com a AIDS, doenças autoimunes ou tumor maligno, fibrose cística, anemia precoce, anemia relacionada à doença inflamatória crônica, lesão da medula espinhal; perda aguda de sangue, envelhecimento e câncer com produção anormal de células sanguíneas vermelhas.

[00042] Os derivados de peptídeo mimético de EPO e seus sais farmacêuticos previstos na presente invenção são capazes de promo-

ver aumento significativo na contagem de reticulócitos no sangue periférico do camundongo, indicando que eles estimulam a eritropoiese, ao mesmo tempo, eles também são capazes de estender muito a vida útil dos conjugados no corpo. Derivados de peptídeo mimético de EPO e da proteína de EPO não têm influência significativa em glóbulos vermelhos maduros, hematócritos de célula sanguínea, conteúdo de hemoglobina, e também não têm influência significativa sobre a contagem de células sanguíneas brancas periféricas.

[00043] Síntese em fase sólida é utilizada para sintetizar monômeros de peptídeo mimético de EPO, cujo princípio básico é: primeiramente conectar hidroxila de aminoácidos de hidroxila-terminal de cadeia peptídica a ser sintetizado com uma resina de polímero insolúvel via ligação covalente. Então os aminoácidos anexados ao veículo em fase sólida são utilizados como componente de amino para estender a cadeia polipeptídica através da remoção de grupo de proteção de amino e reagindo com componente ativo de carboxila excessiva. Repetir (condensação → lavagem → desproteção → lavagem → a próxima rodada de condensação) operação para atingir o comprimento desejado de cadeia de peptídeo sintético. Finalmente cadeia de peptídeo é retirada da resina. Após um tratamento de purificação, o peptídeo desejado é produzido. O controle do meio das etapas de reação de condensação e desproteção expõe método de detecção de ninidrina, ou seja, quando a cadeia peptídica de resina tem amino livre, uma cor azul aparecerá após coloração pelo reagente de ninidrina. Quando não há amino livre, nenhuma reação de cor será desenvolvida (reagente de ninidrina em si é amarelo). Portanto, após a realização da reação de condensação e detecção por ninidrina, se a cor amarela estiver presente (a cor do reagente de ninidrina em si mesmo), isso significa que essa etapa de acoplamento está concluída e operação de desproteção antes do acoplamento do próximo aminoácido pode ser realiza-

da. Se a cor azul estiver presente, isso significa que ainda existem alguns aminoácidos livres na cadeia peptídica. É necessário repetir acoplamento adicional ou alterar o agente de condensação atual até que a cor amarela esteja presente no peptídeo de resina após detecção por ninidrina.

[00044] O método de ciclização de peptídeo de monômero é conhecido por um versado na técnica. Ciclização de ligações de dissulfeto se dá principalmente através da oxidação da sulfidril na cadeia lateral do aminoácido do peptídeo de monômero em ligações de dissulfeto pelo oxidante. Especificamente, peptídeos de monômero são colocados em solução de DMSO ou 5% de solução de bicarbonato de amina para serem auto-oxidados, ou adicionados à solução de ácido acético contendo I_2 para serem oxidados, preferivelmente adicionados à solução de ácido acético contendo I_2 para serem oxidados. Ciclização de ligação de amida se dá principalmente através da formação de ligação de amida entre grupo carboxila e um grupo amino da cadeia lateral de aminoácidos do peptídeo de monômero na presença do agente de condensação. O agente de condensação adicionado é conhecido por um versado na técnica, geralmente incluindo DIC, EDC, HATU, Pybop, etc.

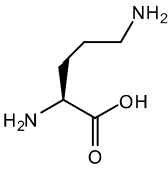
[00045] Síntese de peptídeos diméricos se dá principalmente através da formação de ligação $-NH-CH_2-$ ou ligação $-NH-CO$ entre aminoácidos de cadeia lateral do resíduo de aminoácido de monômero de peptídeo mimético de EPO e pequena molécula funcional. Um versado na técnica pode facilmente sintetizar pequena molécula funcional e conectá-la com o peptídeo cíclico de peptídeo de monômero através da tecnologia conhecida.

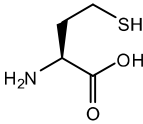
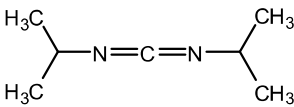
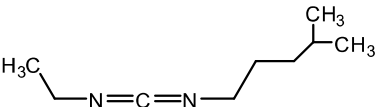
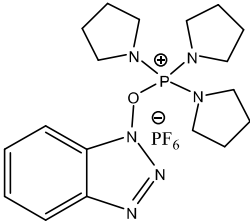
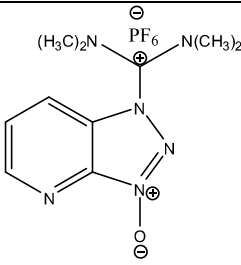
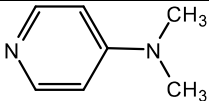
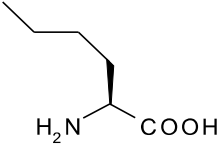
[00046] Peptídeo dimérico e derivados de metóxi polietileno glicol ativo são derivados. O sistema de reação pode ser selecionado a partir do sistema de solvente orgânico ou tampão disponível. Quando reação

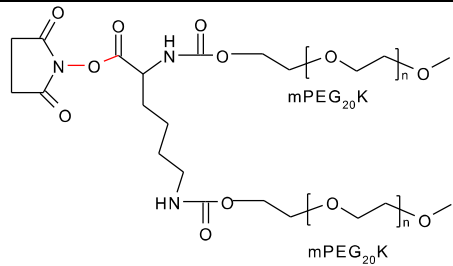
de PEGilação do peptídeo dimérico é realizada em solvente orgânico, os seguintes álcalis podem ser adicionados em uma quantidade adequada, incluindo mas não limitados a, tais como trietilamina, diisopropil etilamina, piridina, 2,4,6-trimetil-piridina. Quando a reação de derivatização de polietileno glicol é realizada no sistema de tampão, o sistema de tampão pode ser selecionado a partir de uma variedade de tampão disponível conhecido, de preferência tampão de fosfato com pH 7,7.

[00047] A atividade biológica de EPO ou derivados de peptídeo mimético de EPO e seus sais farmacêuticos provida por esta invenção pode ser determinada por vários ensaios conhecidos neste campo. Teste da atividade in vivo é realizado da seguinte forma: camundongos são subcutaneamente injetados com EPO e derivados de peptídeo mimético de EPO e seus sais farmacêuticos providos por esta invenção em três dias consecutivos. Os camundongos são sacrificados. Todo o sangue é tirado para realizar contagem de células sanguíneas periféricas e reticulócitos. A contagem das células sanguíneas é feita por contador automático de células sanguíneas. Estudo farmacodinâmico é realizado pela administração intravenosa em macacos com uma dose de 1,35 mg/kg. A dose de proteína de EPO como um fármaco de controle é 240µ/kg. Os fármacos são administrados três vezes por semana e continuam durante seis semanas. As amostras de sangue são coletadas para realizar uma análise do índice hematológico relacionado.

[00048] Resumo de abreviações usadas na invenção:

Abreviações	Nome	Estrutura
Orn	L-Ornitina	

Abreviações	Nome	Estrutura
Hoc	L-Homocisteína	
DIC	N,N'-Di-isopropil-carbodiimida	
EDC	Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilamino-propil) Carbodiimida	
PyBOP	hexafluorofosfato de Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinafosfônio	
HATU	Hexafluorofosfato Metanamínio de 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil urônio	
DMAP	4-dimetilaminopiridina	
Nle	norleucina	

Abreviações	Nome	Estrutura
MPEG ₂ -OSU(40k)	Metóxi polietileno glicol de N-Hidroxissuccinimida(40k)	

[00049] Descrição das Figuras

[00050] A figura 1 mostra a influência de derivados de peptídeo mimético de EPO (HH-EPO-018) em hematócrito de macacos.

[00051] A figura 2 mostra a influência de derivados de peptídeo mimético de EPO (HH-EPO-018) em hemoglobina de macacos.

MODALIDADES PREFERIDAS

[00052] Para uma descrição mais detalhada da invenção, os exemplos a seguir estão provados. No entanto, o escopo da presente invenção não se limita a isso.

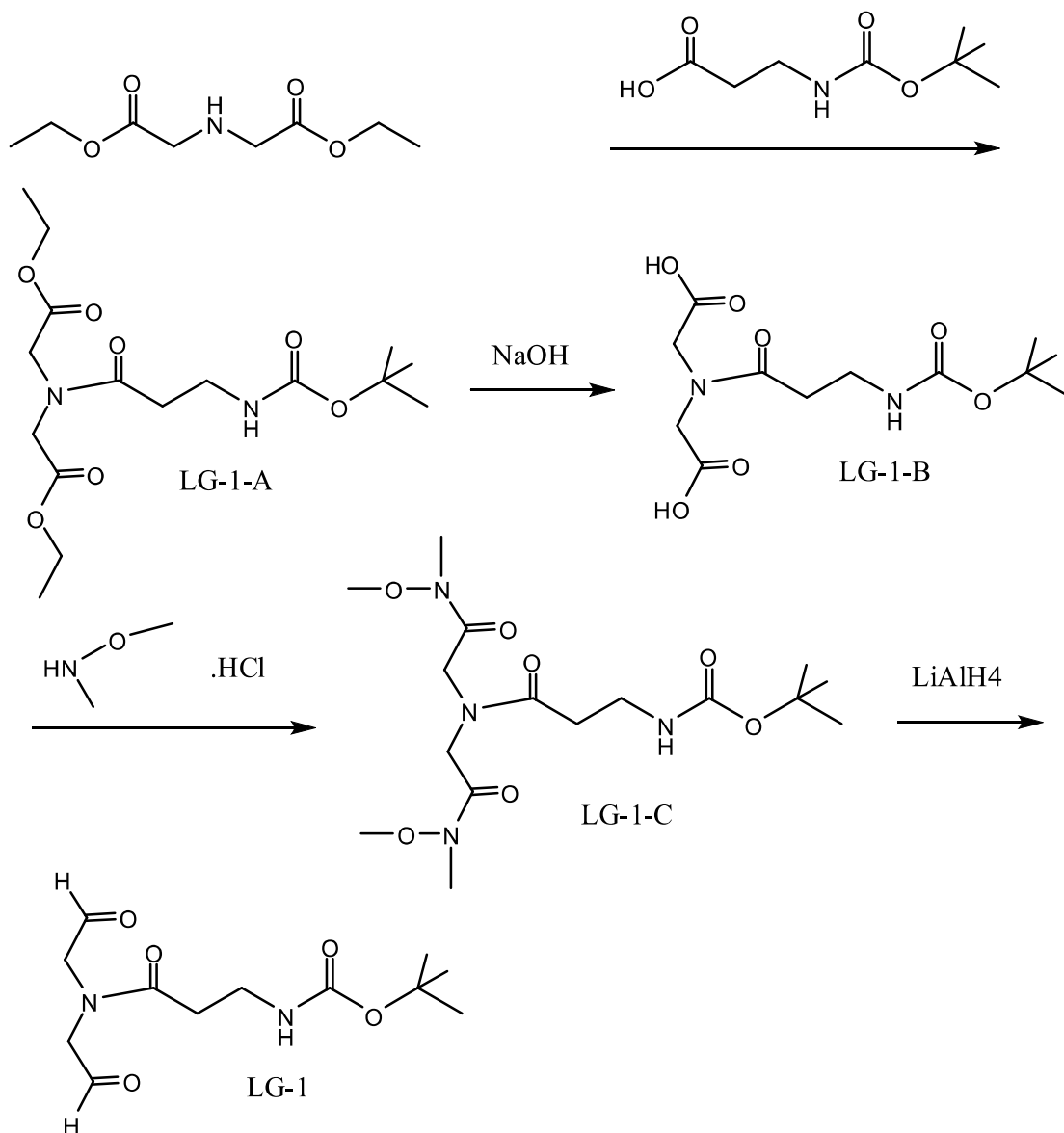
Exemplo 1: síntese de Peptídeo de monômero de peptídeo mimético de EPO

[00053] Síntese de Peptídeo de monômero de peptídeo mimético de EPO é realizada através de um método de síntese de peptídeos em fase sólida. Este método de síntese de peptídeos tem sido relatado em muitas literaturas, ver Stewart, J.M., and Young, J.D., síntese de peptídeos em fase sólida 2^o edição, notas de síntese de peptídeos novabiochem. Derivados de peptídeo de monômero de peptídeo mimético de EPO providos por esta invenção são realizados por métodos de síntese manual. A resina é resina rink amind. O α -amino dos derivados de aminoácidos está protegido por Fmoc (carbonil fluoreno-formil). O grupo tiol da cadeia lateral de cisteína, o grupo amino da cadeia lateral de glutamina, e o grupo imidazol da cadeia lateral de histidina são protegidos pelo Trt (tritila). O grupo guanidina da cadeia lateral de arginina é protegido por Pbf (2,2,4,6,7-Pentametildi-hidrobenzofuran-5-sulfonila).

O grupo indol de cadeia lateral de triptofano, o grupo amino da cadeia lateral de lisina estão protegidos por Boc (terc-butoxicarbonila). O grupo hidroxila da cadeia lateral de treonina, o grupo fenol da cadeia lateral de tirosina, o grupo hidroxila da cadeia lateral de serina estão protegidos por tBu (terc-butila). A carboxila do C-terminal da cadeia peptídica do peptídeo de monômero de derivado de peptídeo mimético de EPO a ser sintetizada é anexada à resina insolúvel (resina rink amind) por ligação covalente. Em seguida aminoácidos anexados ao veículo em fase sólida são utilizados como componente de amino para estender a cadeia polipeptídica após a remoção de grupos de proteção de amino em 20% de piperidina / solução de DMF e reagir com excesso de derivado de aminoácidos. Repetir (condensação → lavagem → desproteção → lavagem → a próxima rodada de condensação) operação para atingir o comprimento desejado de cadeia de peptídeo sintético. Finalmente a cadeia de peptídeo é retirada da resina usando uma solução mista de ácido trifluoroacético, água, mercaptano etileno, 3-isopropil silano (92,5: 2,5: 2,5: 2,5). Após sedimentação de éter, o derivado de peptídeo mimético de EPO de peptídeo de monômero bruto é obtido. O peptídeo de monômero bruto é separado e purificado por coluna preparativa de fase reversa de C18. Então peptídeo de monômero de derivado de peptídeo mimético de EPO é obtido. O controle de meio das etapas de reação de condensação e desproteção explora o método de detecção de ninidrina, ou seja, quando cadeia peptídica de resina tem amino livre, uma cor azul aparecerá após coloração pelo reagente de ninidrina. Quando não há amino livre, nenhuma reação de cor será desenvolvida (reagente de ninidrina em si é amarelo). Portanto, após a realização da reação de condensação e detecção por ninidrina, se a cor amarela estiver presente (a cor do reagente de ninidrina em si), isso significa que essa etapa de acoplamento está concluída e operação de desproteção antes do acoplamento do próximo aminoáci-

do pode ser realizada. Se a cor azul estiver presente, isso significa que ainda existem alguns aminoácidos livres na cadeia peptídica. É necessário adicionalmente repetir ou alterar o agente de condensação atual até que cor amarela esteja presente no peptídeo de resina após detecção por ninidrina.

Exemplo 2: Preparação de pequenas moléculas funcionais (LG-1)



Etapa 1: Preparação de LG-1-A

[00054] Dissolver o éster etílico de ácido iminodiacético (10,0g, 52,8 mmols), Boc- β -alanina (10,0g, 52,8 mmols) em 100 mL de diclorometano, adicionar DIC (8,0mL, 52,8 mmols), agitar em temperatura ambi-

ente durante a noite, filtrar a solução de reação, lavar o filtrado com 100ml de NaHCO₃ saturado, 50ml de solução de HCl a 0,5N, 100ml de solução salina saturada, por sua vez, separar a camada orgânica, secar a camada orgânica com MgSO₄ anidro. Filtrar a camada orgânica, concentrá-la e obter substância líquida oleosa incolor LG-1-A: 17g.

Etapas 2: Preparação de LG-1-B

[00055] Dissolver 17g de LG-1-A em 100 mL de MeOH: THF = mistura a 1:1, em seguida, adicionar 25 ml de água, 5g de NaOH (125 mmols). Ajustar o valor de pH para um com HCl a 6N após 2h de agitação à temperatura ambiente. Extrair a solução de reação com acetato de etila quatro vezes. A camada orgânica é lavada com solução salina, seca com sulfato de magnésio anidro, concentrada sob pressão reduzida, para produzir um semissólido branco. Dissolver os produtos em 50 ml de diclorometano, e adicionar 300ml de n-hexano. A solução é uma pasta branca. Após concentração em pressão reduzida um sólido branco LG-1-B: 14g é obtido (rendimento é de cerca de 90%).

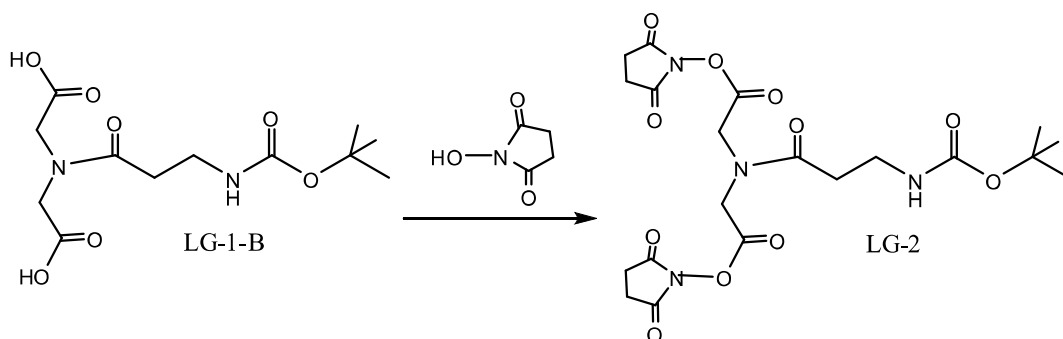
Etapas 3: Preparação de LG-1-C

[00056] Dissolver 7g LG-1-B (23 mmols) em 80ml de tetra-hidrofurano, e com agitação adicionar 4,6g de N, N-cloridrato de metóxi-metil-amina (46 mmols) e 5,1g de trietilamina (51 mmols), e depois adicionar 4,4g de DIC (32 mmols), 4,7g de HOBt (32 mmols). Agitar a reação durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, o líquido de reação é adicionado na água e extraído com 350ml de acetato de etila. A camada orgânica é lavada com 200ml de solução aquosa de HCl a 2N, 200ml de solução de bicarbonato de sódio saturada, 100ml de solução salina saturada, por sua vez. A camada orgânica é separada e seca com sulfato de magnésio anidro por 2 horas e depois filtrada. O filtrado se torna substância oleosa após concentração em pressão reduzida. Após a cromatografia de coluna, o produto-alvo LG-1-C é coletado: 4,2 g, rendimento: 70%.

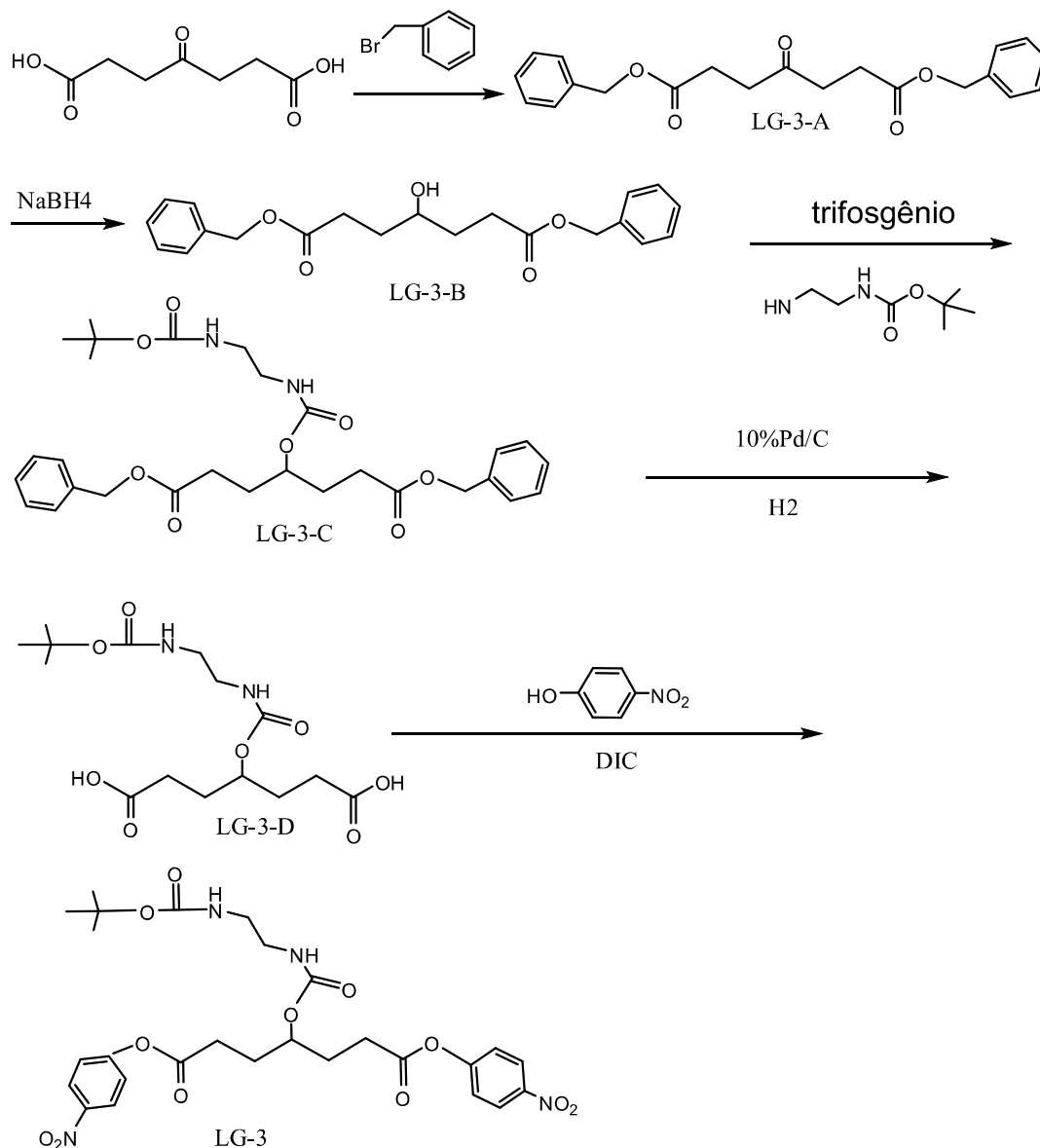
Etapa 4: Preparação de LG-1

[00057] Dissolver 4,0 g de LG-1-C (10,2 mmols) em 60ml de tetra-hidrofurano, resfriar a 0 °C com banho de sal no gelo. Adicionar LiAlH₄ (340mg, 8,9 mmols). Após a reação a 0 °C por 30 minutos, adicionar 4 ml de água, 4 ml de solução de NaOH a 15% por sua vez. Filtrar a solução de reação. O filtrado é lavado com tetra-hidrofurano. Após concentração para secar e cromatografia de coluna em sílica-el, LG-1 é obtido: 1,63g, (6 mmols, Rendimento: 58,8%)

Exemplo 3: Preparação de pequenas moléculas funcionais (LG-2)



[00058] Dissolver 4g de LG-1-B (13 mmols) em 100 mL de N,N-dimetilformamida, e adicionar hidroxissuccinimida (3,1 g, 21 mmols), DIC (4mL 26 mmols) e MSPA (4-dimetilamino piridina) (12mg, 0,08 mmol). Depois de ter sido agitada durante a noite, a solução de reação é concentrada a pressão reduzida. Dissolver o resíduo em 80ml de acetato de etila. As substâncias insolúveis foram filtradas. A fase orgânica é lavada sucessivamente com 40 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio, 40ml de solução salina saturada, 40ml de solução de HCl a 0,5N, 40ml de solução salina saturada por um tempo. A camada orgânica é separada e seca com sulfato de magnésio anidro. Filtrar a camada orgânica. O filtrado é concentrado sob pressão reduzida. Um sólido branco LG-2 é obtido: 4,4g (rendimento é de cerca de 68%).

Exemplo 4: Preparação de pequenas moléculas funcionais (LG-3)**Etapas 1: Preparação de LG-3-A**

[00059] Dissolver 7,0g de pentanona de ácido pimélico (0,04 mol) em 100ml de metanol. Adicionar 5% de solução de metanol CsCO₃ com agitação, e controlar a quantidade de adição para tornar o pH da solução de reação de cerca de 8,5 (determinado pelo teste exato de papel de pH). Agitar por 30 minutos após o término da adição. Em seguida, filtrar a solução de reação. O filtrado se torna uma substância oleosa após a concentração a vácuo. Dissolver a substância oleosa em cerca de 100ml de DMSO e aquecer a 60 °C. Adicionar 14g

(0,08mol) de brometo de benzila. Após a reação por 8 horas, filtrar a solução de reação, lavar o sólido com uma pequena quantidade de éter. Adicionar 400ml de éter em licor-mãe, lavá-lo com 200ml de solução salina saturada. Separar a camada orgânica e secar com sulfato de magnésio anidro por 2 horas. Então filtrá-la. Quando o filtrado estiver concentrado a pressão reduzida em 1/5 do seu volume original, ele é colocado no freezer durante a noite a -20 °C para cristalizar. No dia seguinte, filtrar os sólidos, secar, e obter um sólido branco LG-3-A: 10,5 g (rendimento 74%).

Etapas 2: Preparação de LG-3-B

[00060] Dissolver 2g de LG-3-A (0,0056 mol) em 20ml de tetra-hidrofurano. Manter a temperatura no interior da solução abaixo de -10 °C, agitar e adicionar 626mg de NaBH₄ (0,0168 mol). Após a reação por 1h, adicionar 200ml de éter refrigerado, seguido pela adição de 150ml de solução de bicarbonato de sódio saturada para finalizar a reação. Manter em repouso para permitir delaminato. A camada orgânica é lavada por um tempo com solução salina saturada e, em seguida seca com Na₂SO₄ anidro por 2 horas e filtrada. O filtrado é concentrado sob pressão reduzida, para produzir LG-3-B: 1,9g (Rendimento: 94,6%).

Etapas 3: Preparação de LG-3-C

[00061] Dissolver 3,2 g de LG-3-B (0,009 mol) em 50ml de diclorometano. Adicionar 4,34g de trietilamina (0,043 mol) abaixo de 0 °C com agitação. Dissolver 1,33g (0,0045 mol) de trifosgênio em 25ml de diclorometano. Em seguida, adiciona-lo na solução acima gota a gota. Adicionar 2,8g de terc-butoxicarbonil etilenodiamina, após 1 hora. Após a reação por 3h, a mistura de reação é ajustada para neutro com ácido acético glacial e, neste momento um precipitado é gerado. Filtrar o precipitado. O filtrado é concentrado sob pressão reduzida e, em seguida, dissolvido em éter. Em seguida, lavado com água por três ve-

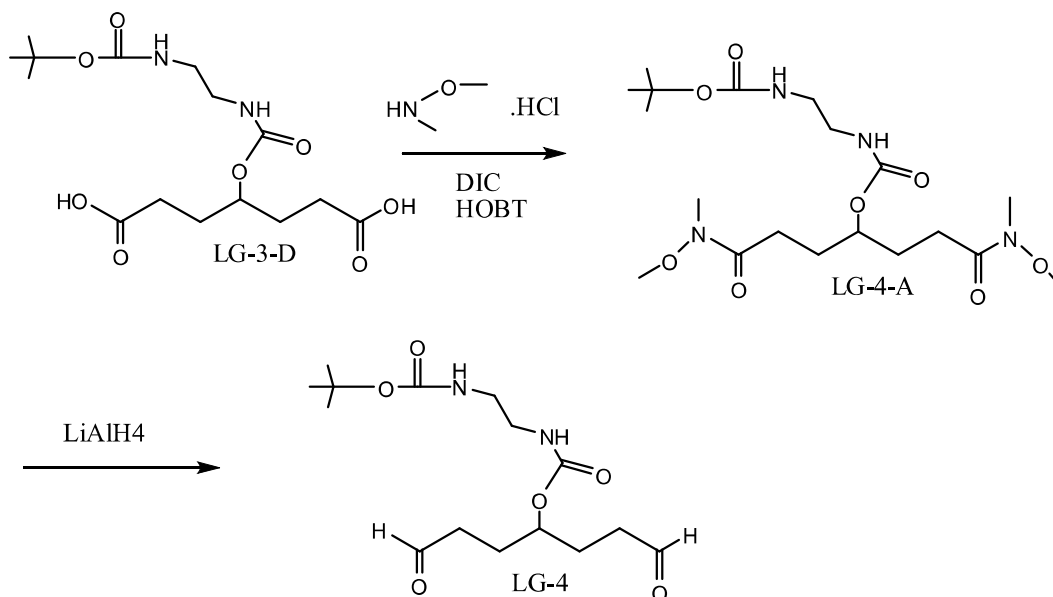
zes, com solução salina saturada por um tempo. A camada orgânica é separada e seca com sulfato de magnésio anidro por 2 horas e depois filtrada. O filtrado é concentrado sob pressão reduzida para ser oleoso. A substância oleosa é purificada por cromatografia em coluna de sílica-gel (fase móvel: éter de petróleo: acetato de etila = 10:1). O produto alvo é combinado e coletado, e é concentrado para produzir um sólido branco LG-3-C: 1,5 g (rendimento 38,8%).

Etapas 4: Preparação de LG-3-D

[00062] Dissolver 13g de LG-3-C (0,031 mol) em 8ml de metanol e adicionar cerca de 200mg de Pd-C a 10%, com agitação. Após reação com H₂ à pressão atmosférica por 4h, filtrar o carvão ativado, e o filtrado é concentrado para produzir a substância oleosa LG-3-D: 8,28g (Rendimento: 96,7%).

Etapas 5: Preparação da LG-3

[00063] Dissolver 5g de LG-3-D (0,018 mol) em 10ml de tetra-hidrofurano. Adicionar 4,7 g de p-nitrofenol (0,043 mol), e adicionar 4,2g de solução DIC (0,043) com agitação. Misturar a reação durante a noite. No dia seguinte filtrar o precipitado resultante, lavar a torta de filtro com uma pequena quantidade de acetato de etila, secar o filtrado pela concentração à pressão reduzida. Adicionar 100 ml de acetato de etila no resíduo e torná-lo dissolvido. Lavar com 50 ml de solução salina saturada por um tempo. Separar a camada orgânica e secar com sulfato de magnésio anidro por 2 horas. Em seguida, filtrá-lo. Concentrar o filtrado sob pressão reduzida para a produção de substância oleosa. Substância oleosa é purificada por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: hexano / acetato de etila 20:01 = 10:01). O produto alvo é combinado e coletado, e concentrado em pressão reduzida até secar para produzir um sólido branco LG-3: 3,5g (rendimento: 32%).

Exemplo 5: Preparação de pequena molécula funcional (LG-4)**Etapa 1: Preparação da LG-4-A**

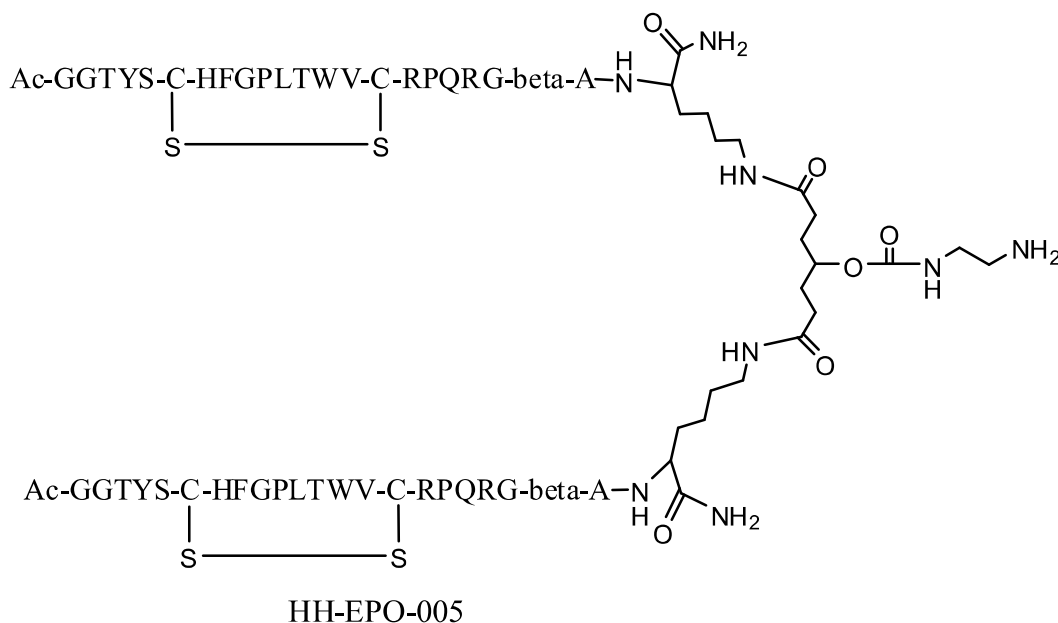
[00064] Dissolver 5g de LG-3-D (0,018 mol) em 60ml de tetra-hidrofurano. Adicionar 3,51g de cloridrato de N,N-metóxi-metil-amina (0,036 mol) e 4,0 g de trietilamina (0,04mol), com agitação. Em seguida, adicionar DIC 3,4g (0,027mol) e 3,65g HOBT (0,027mol). Agitar a reação durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, adicionar a solução de reação em 200ml de água e extrair com acetato de etila, duas vezes, cada 200ml de tempo. Combinar camada orgânica. Lavar por sua vez, com 50ml de solução de HCl a 2N, 100 ml de solução saturada de NaHCO_3 , 100ml de solução salina saturada por um tempo. Separar a camada orgânica, secar por 2 horas com sulfato de magnésio anidro. Em seguida, filtrá-lo. O filtrado é concentrado sob pressão reduzida, para a produção de substância oleosa. A substância oleosa é purificada por cromatografia em coluna (eluente: hexano / acetato de etila 10:1). O componente de destino é combinado para produzir um sólido branco LG-4-A: 6.24g (Rendimento: 80%).

Etapa 2: Preparação de LG-4

[00065] Dissolver 4,0 g de LG-4-A (9 mmols) em 50ml de tetra-hidrofurano. Adicionar 300mg de LiAlH_4 (7,9 mmols) à temperatura de

refrigeração abaixo de zero com banho de sal no gelo. Manter a reação em 0 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionar 0,3 ml de água, 0,9ml de NaOH a 15%, 0,3 ml de água, por sua vez, e neste momento um precipitado é gerado. Filtrar o precipitado. A torta de filtro é lavada com tetra-hidrofurano por um tempo. O filtrado é combinado e concentrado sob pressão reduzida, até secar. O resíduo é purificado por cromatografia em coluna para produzir 1,65g de LG-4 (Rendimento: 55,5%).

Exemplo 6: Preparação de HH-EPO-005



Etapa 1: Preparação de Peptídeos Cíclicos SEQ ID NO:5

[00066] Dissolver 9g de peptídeo de monômero de derivado de peptídeo mimético de EPO SEQ ID NO:5 (de síntese de acordo com o método indicado nos exemplos) em 3000ml de ácido acético glacial a 20%, e então lentamente adicionar 5% de solução de metanol de iodo gota a gota até que a cor amarela desapareça. A solução de reação é diretamente submetida à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa usando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), em que a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético)

e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, 3,0g de peptídeo cíclico SEQ ID NO:5 são preparados por liofilização (Rendimento: 15,6%).

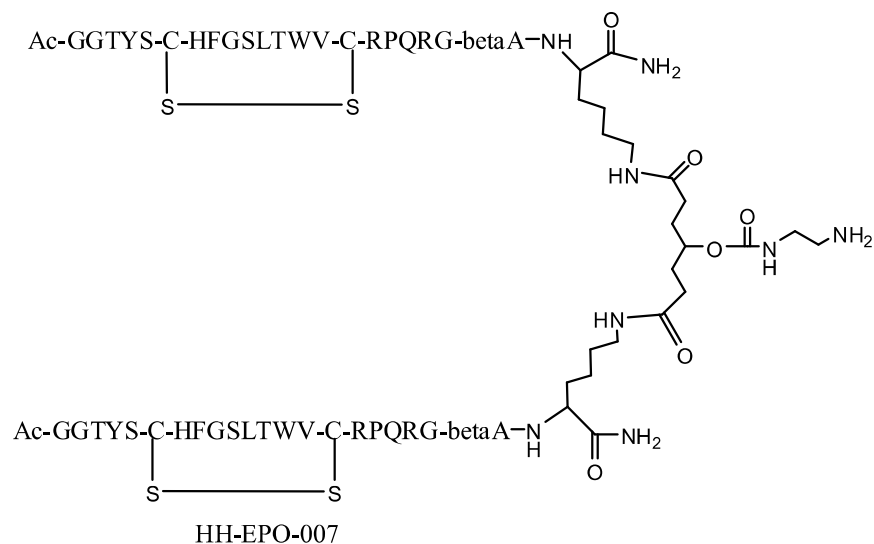
Etapas 2: Preparação de HH-EPO-005

[00067] Dissolver 3,0g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 5 (1,22 mmol) em 150ml de N,N-dimetilformamida. Adicionar 147mg de trietilamina (1,46 mmol), 368mg de pequenas moléculas funcionais (GL-3) (0,61 mmol). Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 6 horas, concentrar parte da N,N-dimetilformamida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. Em seguida, dissolver o sólido branco em 50ml de ácido trifluoroacético a 20% / solução de diclorometano. Após a agitação em temperatura ambiente por 30 minutos, parte do solvente é concentrada à pressão reduzida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. O sólido branco é submetido à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-005: 1,0g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 33%).

Exemplo 7: Preparação de HH-EPO-006

lamina (1,46 mmol), 368mg de pequenas moléculas funcionais (GL-3) (0,61 mmol). Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 6 horas, concentrar parte da DMF. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. Em seguida, dissolver o sólido branco em 50ml de ácido trifluoroacético a 20% / solução de dicloro-metano. Após a agitação em temperatura ambiente por 30 minutos, parte do solvente é concentrada a pressão reduzida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. O sólido branco é submetido à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-006: 3,98g são preparados por liofilização (rendimento é de cerca de 32,7%).

Exemplo 8: Preparação de HH-EPO-007



Etapas 1: Preparação de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 7

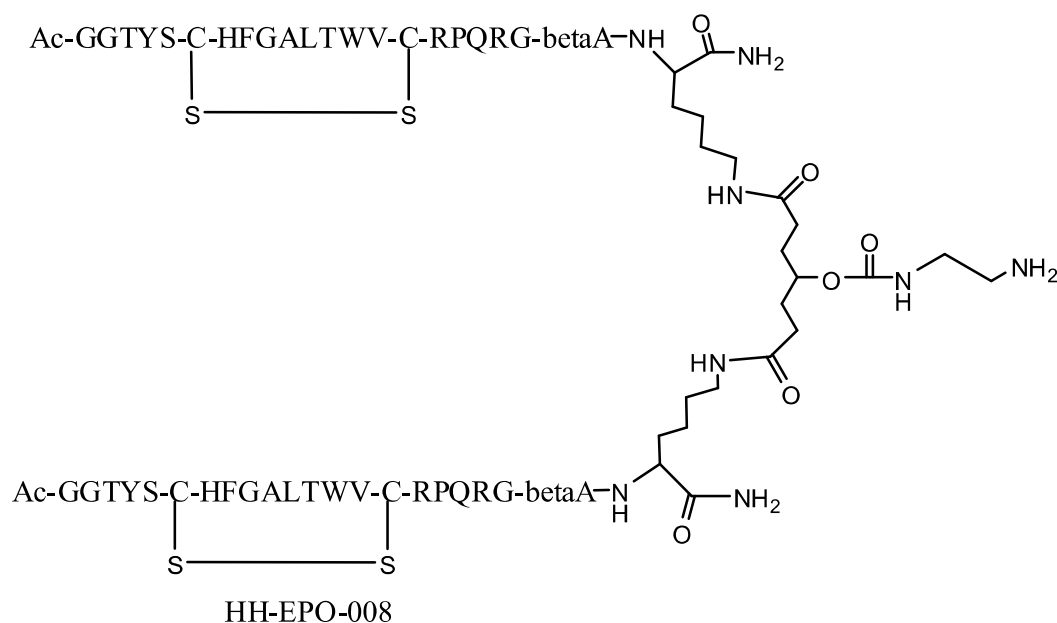
[00070] Dissolver 9g de peptídeo de monômero de derivado de peptídeo mimético de EPO SEQ ID NO: 7 (síntese de acordo com o método indicado nos exemplos) em 3000ml de ácido acético glacial a 20% e, depois, lentamente, adicionar 5% de solução de metanol de iodo gota a gota, até a cor amarela não desaparecer. A solução de reação é diretamente submetida à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5µm, 4,6*100mm), em que a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, 3,15 g de peptídeo cíclico SEQ ID NO: 7 são preparados por secagem por congelamento (Rendimento: 16,4%).

Etapas 2: Preparação de HH-EPO-007

[00071] Dissolver 3,0 g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 7 (1,22 mmol) em 150ml de N,N-dimetilformamida. Adicionar 147mg de trietilamina (1,46 mmol), 368mg de pequenas moléculas funcionais (GL-3) (0,61 mmol). Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 6 horas, concentrar parte da N,N-dimetilformamida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. Em seguida, dissolver o sólido branco em 50ml de ácido trifluoroacético a 20% / solução de diclorometano. Após a agitação em temperatura ambiente por 30 minutos, parte do solvente é concentrada a pressão reduzida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. O sólido branco é submetido à purificação preparativa por cro-

matografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecilsilano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-007: 1,0g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 33%).

Exemplo 9: Preparação de HH-EPO-008



Etapa 1: Preparação de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 8

[00072] Dissolver 27g de monômero peptídeo mimético de EPO de peptídeo derivado SEQ ID NO: 8 (síntese de acordo com o método indicado nos exemplos) em 3000ml de ácido acético glacial a 20% e, depois, lentamente, adicionar 5% de solução de metanol de iodo gota a gota, até a cor amarela não desaparecer. A solução de reação é diretamente submetida à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de

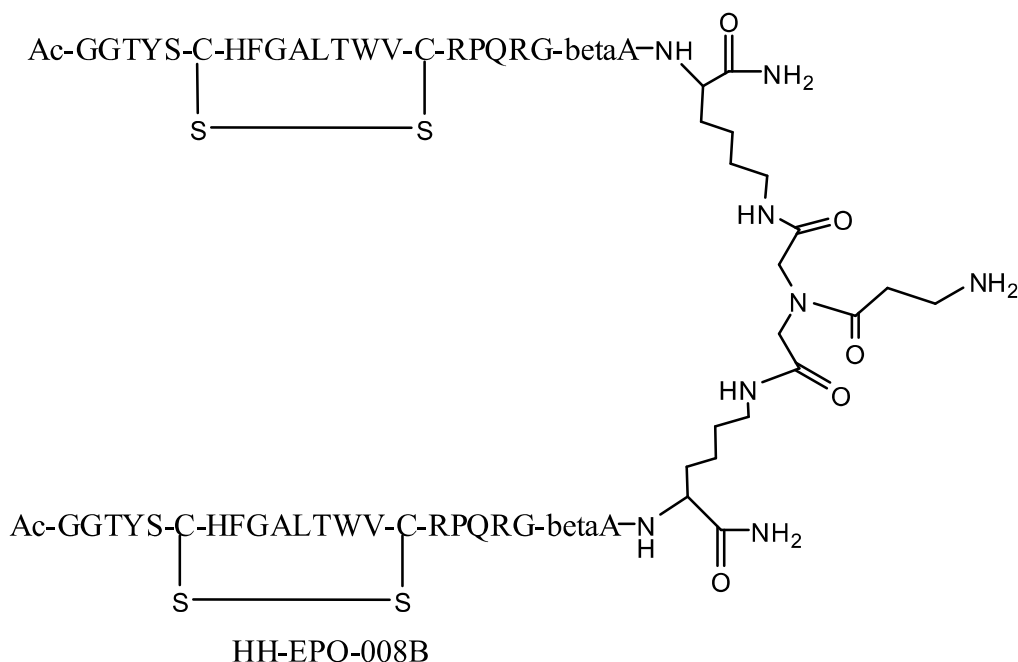
detecção é de 214nm ; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, 9,3 g SEQ ID NO: 8 peptídeo cíclico são preparados por liofilização (Rendimento: 15,7%).

Etapas 2: Preparação de HH-EPO-008

[00073] Dissolver 3,0 g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 8 (1,22 mmol) em 150ml de N,N-dimetilformamida. Adicionar 147mg de trietilamina (1,46 mmol), 368mg de pequenas moléculas funcionais (GL-3) (0,61 mmol). Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 6 horas, concentrar parte da N,N-dimetilformamida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. Em seguida, dissolver o sólido branco em 50ml de ácido trifluoroacético a 20% / solução de diclorometano. Após a agitação em temperatura ambiente por 30 minutos, parte do solvente é concentrada a pressão reduzida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. O sólido branco é submetido à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-008: 1,12g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 33%).

Exemplo 10: Preparação de HH-EPO-008A

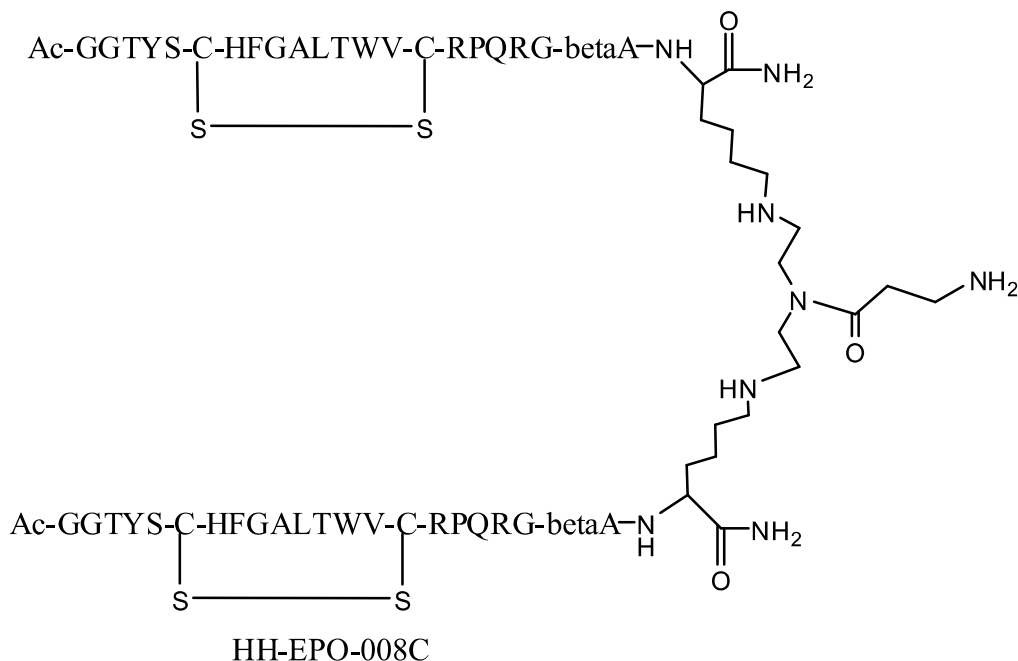
[00074] 3,0 g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 8 (1,22 mmol) dissolvidos em 150ml de tampão ácido acético 20 mmols (pH5,0), e depois adicionar 201mg de pequenas moléculas funcionais (LG-4) (0,61 mmol) e 10 ml de acetonitrila. Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 30 minutos, a solução é submetida à reação de purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é 214nm, água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-008A: 0,75 g é preparado por liofilização (Rendimento: 25%).

Exemplo 11: Preparação de HH-EPO-008B

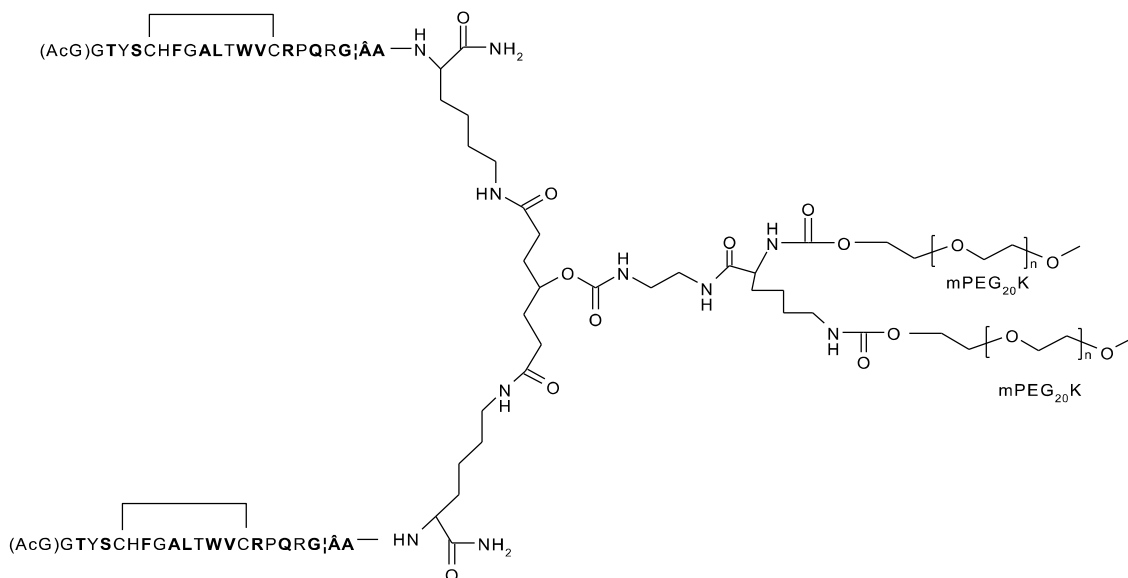
[00075] Dissolver 3,0 g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 8 (1,22 mmol) em 150ml de N,N-dimetilformamida. Adicionar 147mg de trietilamina (1,46 mmol), 322mg de pequenas moléculas funcionais (LG-2) (0,61 mmol). Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 6 horas, concentrar parte da N,N-dimetilformamida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. Em seguida, dissolver o sólido branco em 50ml de ácido trifluoroacético a 20% / solução de diclorometano. Após a agitação em temperatura ambiente por 30 minutos, parte do solvente é concentrada a pressão reduzida. Adicionar 200ml de éter no resíduo, colocar na geladeira por 2 horas e, em seguida, centrifugar. Um sólido branco é obtido por vácuo seco. O sólido branco é submetido à purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido triflu-

oroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-008: 1,3g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 43%).

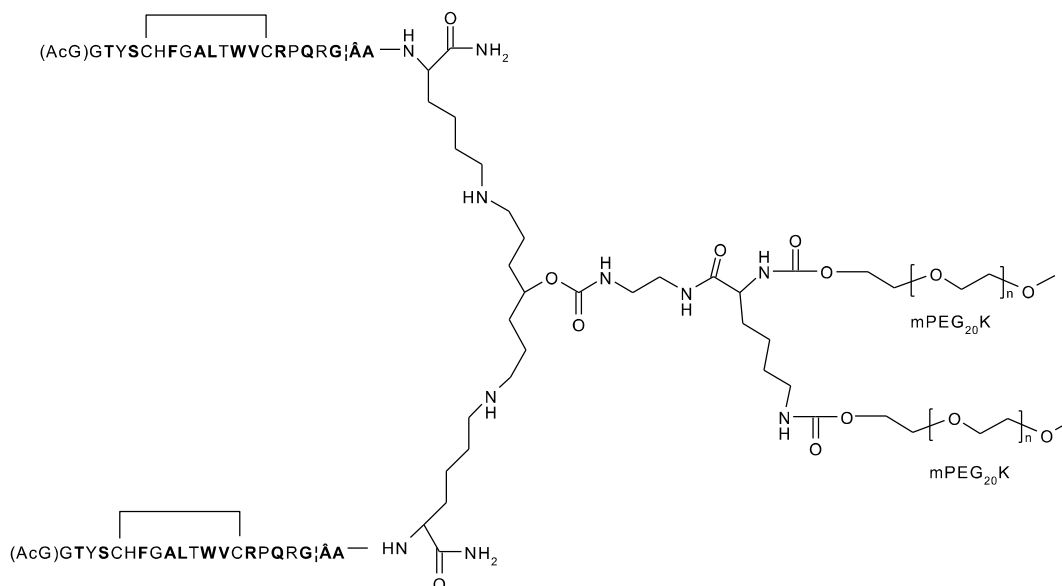
Exemplo 12: Preparação de HH-EPO-008C



[00076] 3,0 g de peptídeos cíclicos SEQ ID NO: 8 (1,22 mmol) dissolvidos em 150ml de tampão de ácido acético 20 mmols (pH5,0), e depois adicionar 165mg de pequenas moléculas funcionais (LG-1) (0,61 mmol) e 10 ml de acetonitrila. Depois de ter agitado a reação à temperatura ambiente por 30 minutos, a solução é submetida à reação de purificação preparativa por cromatografia de fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5µm, 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é 214nm, água (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-008C: 0,8g é preparado por liofilização (Rendimento: 27%).

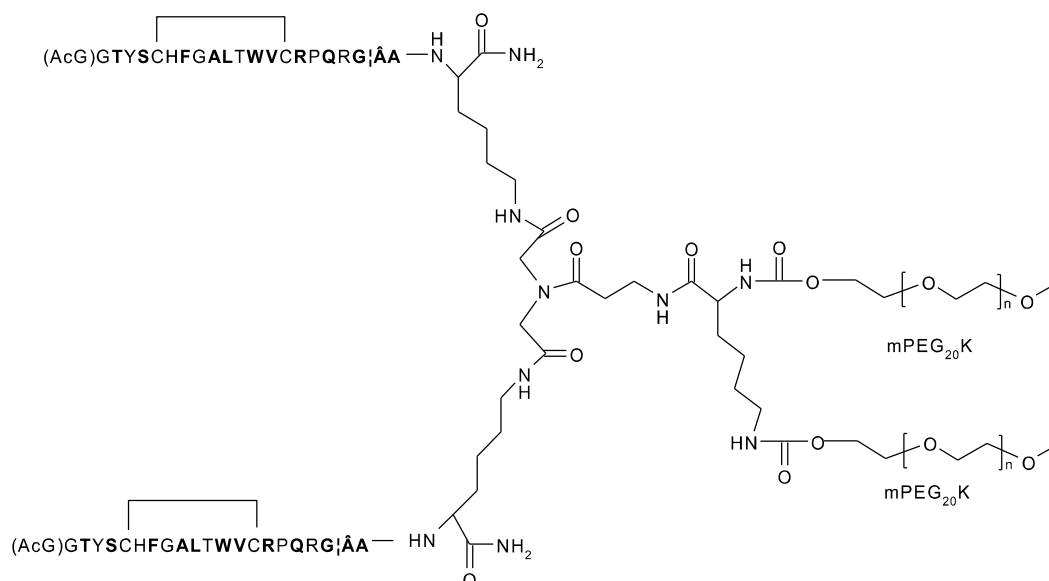
Exemplo 13: Preparação de HH-EPO-018

[00077] Dissolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmol) em 100ml de N,N-dimetilformamida, adicionar 39,6mg de trietilamina (0,196 mmol), 3,8 g de MPEG₂-OSU (40K) (0,96 mmol). Agitar a reação à temperatura ambiente por 6 horas. Colocar a solução de reação diretamente em 600ml de éter frio. O sólido é precipitado. Depois de colocar na geladeira por 2 horas, centrifugar e HH-EPO-018 bruto é obtido por vácuo seco. HH-EPO-018 bruto é purificado por cromatografia em fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5µm 4,6*100mm), onde a temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (com 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-018: 1,8g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 47%).

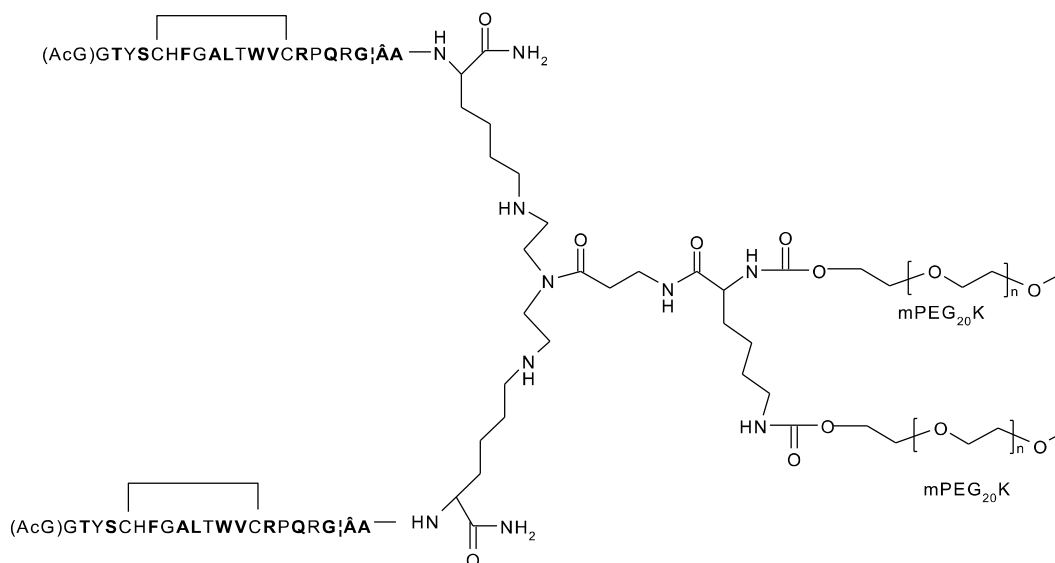
Exemplo 14: Preparação de HH-EPO-018A

[00078] Dissolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmol) em 100ml de N,N-dimetilformamida, adicionar 39,6mg de trietilamina (0,196 mmol), 3,8 g de MPEG₂-OSU (40K) (0,96 mmol). Agitar a reação à temperatura ambiente por 6 horas. Colocar a solução de reação diretamente em 600ml de éter frio. O sólido é precipitado. Depois de colocar na geladeira por 2 horas, centrifugar e HH-EPO-018 bruto é obtido por vácuo seco. HH-EPO-018 bruto é purificado por cromatografia em fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5µm, 4,6*100mm) em que temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (com 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-018A: 1,5g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 39%).

Exemplo 15: Preparação de HH-EPO-018B



[00079] Dissolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmol) em 100ml de N,N-dimetilformamida, adicionar 39,6mg de trietilamina (0,196 mmol), 3,8 g de MPEG₂-OSU (40K) (0,96 mmol). Agitar a reação à temperatura ambiente por 6 horas. Colocar a solução de reação diretamente em 600ml de éter frio. O sólido é precipitado. Depois de colocar na geladeira por 2 horas, centrifugar e HH-EPO-018 bruto é obtido por vácuo seco. HH-EPO-018 bruto é purificado por cromatografia em fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShieldTM RP18 3,5µm, 4,6*100mm) em que temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (com 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-018: 1,7 g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 45%).

Exemplo 16: Preparação de HH-EPO-018C

[00080] Dissolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmol) em 100ml de N,N-dimetilformamida, adicionar 39,6mg de trietilamina (0,196 mmol), 3,8 g de MPEG₂-OSU (40K) (0,96 mmol). Agitar a reação à temperatura ambiente por 6 horas. Colocar a solução de reação diretamente em 600ml de éter frio. O sólido é precipitado. Depois de colocar na geladeira por 2 horas, centrifugar e HH-EPO-018 bruto é obtido por vácuo seco. HH-EPO-018 bruto é purificado por cromatografia em fase reversa, utilizando sílica-gel ligada por octadecil silano como carga de coluna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5µm, 4,6*100mm) em que temperatura da coluna é de 60 °C e o comprimento de onda de detecção é de 214nm; água (com 0,05% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila (contendo 0,05% de ácido trifluoroacético), em diferentes proporções são utilizadas como fase móvel. Combinar e coletar as frações-alvo. Depois, a maioria da acetonitrila é destilada sob pressão reduzida, HH-EPO-018: 1,4g é preparado por liofilização (rendimento é de cerca de 37%).

Exemplo 17: Efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO em camundongos**Objetivo deste experimento**

[00081] Para avaliar e comparar os efeitos de derivados de peptí-

deo mimético de EPO e da proteína de EPO em eritropoiese de camundongos.

Materiais e métodos:

[00082] Derivados de peptídeo mimético de EPO, incluindo HH-EPO-001, EPO-HH-002, HH-EPO-003, HH-EPO-004, HH-EPO-005, HH-EPO-006, HH-EPO-007, HH-EPO-008, HH-EPO-015, HH-EPO-016, HH-EPO-017 e HH-EPO-018 são fornecidos por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical co.,LTD. EPO é comprador de Shenyang Sansheng Pharmaceutical Co., Ltd. Kunming camundongos são comprados de the Chinese Academy of Sciences Shanghai Experimental Animal Center, pesando 25 ~ 30g, ♀. O número de animais em cada grupo é de 10.

[00083] Os camundongos foram injetados subcutaneamente com derivados de peptídeo mimético de EPO e proteína de EPO durante três dias consecutivos. Depois da morte dos camundongos, o sangue foi tomado para realizar contagens das células sanguíneas periféricas e de reticulócitos. A contagem das células sanguíneas é realizada usando um contador de células sanguíneas automático.

Resultados e discussão

[00084] De acordo com a posologia atual, ambos os derivados de peptídeo mimético de EPO e a proteína de EPO podem significativamente promover a contagem de reticulócitos do sangue periférico do camundongo para aumentar, indicando que eles estimulam a eritropoiese (ver Tabela 1). Derivados de peptídeo mimético de EPO e da proteína de EPO não têm influência significativa nas células sanguíneas vermelhas maduras, hematócrito de célula sanguínea, conteúdo de hemoglobina (ver Tabela 2), e também não têm influência significativa sobre a contagem de células brancas do sangue periférico (ver Tabela 3).

[00085] Tabela 1 Efeitos de derivados de peptídeo mimético de

EPO em eritropoiese de reticulócitos de camundongo.

Grupo	Camundongo (número)	Dose e programas	Contagem de reticuló- cito ($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm SD$)
controle	10	0,1%BSA em NS	136,9 $\pm$ 5,6
HH-EPO-005	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	947,2 $\pm$ 14,7
HH-EPO-006	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	515,0 $\pm$ 22,7
HH-EPO-007	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	553,5 $\pm$ 26,6
HH-EPO-008	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	908,1 $\pm$ 21,7
HH-EPO-015	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1146,9 $\pm$ 176,6
HH-EPO-016	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1796,4 $\pm$ 304,4
HH-EPO-017	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1208,9 $\pm$ 178,5
HH-EPO-018	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	2000,6 $\pm$ 272,0
HH-EPO-018A	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1889,3 $\pm$ 252,0
HH-EPO-018B	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1969,7 $\pm$ 312,0
HH-EPO-018C	10	4,5mg/kg,sc,d1-3	1879,3 $\pm$ 162,0
EPO	10	5 μ g/kg,sc,d1-3	483,9 $\pm$ 146,5

[00086] Tabela 2 Efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO em eritropoiese de camundongo, hematócrito de células sanguíneas, conteúdo de hemoglobina.

grupo	Camun- dongo (número)	Dose e progra- mas	Contagem de célula sangui- nea vermelha ($\times 10^6/\mu L$, $\bar{x} \pm SD$)	Hematócrito de células sanguíneas (-)	hemoglobina (-)
controle	10	0,1%BSA em NS	9,6 $\pm$ 0,5	48,2 $\pm$ 3,0	14,8 $\pm$ 0,7
HH-EPO-005	10	4,5mg/kg,sc,d1- 3	10,1 $\pm$ 0,6	54,4 $\pm$ 3,2	16,3 $\pm$ 0,9
HH-EPO-006	10	4,5mg/kg,sc,d1- 3	9,6 $\pm$ 0,5	50,5 $\pm$ 2,8	15,3 $\pm$ 0,9
HH-EPO-007	10	4,5mg/kg,sc,d1- 3	9,1 $\pm$ 3,1	49,4 $\pm$ 17,1	14,8 $\pm$ 4,8
HH-EPO-008	10	4,5mg/kg,sc,d1- 3	9,6 $\pm$ 0,2	54,0 $\pm$ 1,7	16,1 $\pm$ 0,5
HH-EPO-015	10	4,5mg/kg,sc,d1-	10,0 $\pm$ 0,40	54,57 $\pm$ 2,50	15,01 $\pm$ 0,57

		3			
HH-EPO-016	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,88±0,42	56,50±2.95	13,24±4.2
		3			
HH-EPO-017	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,70±0,30	55,84±2.33	14,93±0.55
		3			
HH-EPO-018	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,69±0,33	56,97±3.13	13,22±2.66
		3			
HH-EPO-018A	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,44±0,65	54,47±2.61	14,35±1.35
		3			
HH-EPO-018B	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,77±0,51	55,71±3.31	13,72±2.35
		3			
HH-EPO-018C	10	4,5mg/kg,sc,d1-	9,59±0,53	54,98±2.83	13,86±2.47
		3			
EPO	10	5µg/kg,sc,d1-3	9,0±0,6	46,2±2,7	14,3±0,7

[00087] Tabela 3 Efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO em plaquetas de camundongo, geração de células brancas do sangue

GGrupo	Ca- mun- dongo (núme- ro)	Dose e pro- gramas	plaque- ta(×10 ³ /µL)	Célula sangui- nea verme- lha(×10 ³ /µL)
controle	10	0.1%BSA em NS	1078.0±151.2	5.1±1.5
HH-EPO-005	10	4.5mg/kg,sc,d 1-3	1957.8±349.5	4.2±1.2
HH-EPO-006	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1087,8±118,5	4,1±1,2
HH-EPO-007	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	2082,1±863,9	3,6±0,8
HH-EPO-008	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1685,5±351,3	2,9±0,5
HH-EPO-015	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1106,6±170,,03	4,32±1,29

HH-EPO-016	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1275,88±239,90	5,06±1,41
HH-EPO-017	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1109,60±130,73	4,25±1,65
HH-EPO-018	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1317,50±461,06	4,11±1,31
HH-EPO-018A	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1432,50±453,05	4,23±1,23
HH-EPO-018B	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1337,70±363,06	4,07±1,23
HH-EPO-018C	10	4,5mg/kg,sc,d 1-3	1355,50±331,07	4,21±1,34
EPO	10	5µg/kg,sc,d1-3	1306,8±170,	4,0±0,9

Exemplo 18: Efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO em Macacos

Objetivo deste experimento:

[00088] Para avaliar os efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO em eritropoiese dos Macacos.

Materiais e métodos:

[00089] Derivados de peptídeo mimético de EPO HH-EPO-018 são fornecidos por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical., LTD. EPO é adquirido de Shenyang Sansheng Pharmaceutical Co., Ltd. Diluir em solução salina contendo 0,1% de BSA, antes de ser usado.

[00090] Macacos, pesando 5,5 ~ 8,5 kg, masculino ou feminino, são adquiridos de Suzhou Xishan Zhongke Laboratory Animal Center. Macacos são agrupados de acordo com a base de hemoglobina em cada grupo de três macacos. 1,35mg/kg de HH-EPO-018 é injetado por via venosa uma vez; 240µ/kg de EPO, três vezes por semana, administração contínua por cinco semanas. Medir índices hematológicos 1 ~ 2 vezes por semana.

Resultados e discussão

[00091] Injeção intravenosa única de 018-HH-EPO em macacos leva a um aumento do teor de hemoglobina no sangue periférico, um aumento de hematócrito de células sanguíneas, o que indica que HH-018-EPO estimula a eritropoiese. A estimulação atingiu um pico em 35 dias após a administração, e, em seguida, diminuiu lentamente. O efeito estimulante da hemoglobina é de cerca de 33%. Como controle positivo, EPO também gera o mesmo aumento no teor de hemoglobina do sangue periférico do macaco e hematócrito de células sanguíneas, e seu efeito diminui lentamente após a parada da administração do medicamento. De acordo com o regime de dosagem atual, a estimulação de 018-HH-EPO e EPO na geração de hemoglobina em macacos é considerável (ver figuras 1 e 2).

Exemplo 19: Avaliar e comparar os efeitos de derivados de peptídeo mimético de EPO HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B, e controle positivo de AF37702 em camundongos.

Materiais e métodos:

[00092] H-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B e AF37702 são fornecidos por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical co.,LTD, em que AF37702 também é derivado de peptídeo mimético de EPO, produzido por Affymax (nome comercial: Hematide). Preparar a amostra em solução salina contendo 0,1% de BSA antes de ser usada. Camundongos Kunming são comprados da Chinese Academy of Sciences Shanghai Experimental Animal Center, pesando 25 ~ 30g ♀. O número de animais em cada grupo é de 10. Após a adaptação, os animais são injetados subcutaneamente com 015-HH-EPO, EPO-HH-018, HH-EPO-018B, AF37702. Matar os camundongos no sexto dia após a primeira dose, tomar o sangue total para realizar a contagem de células sanguíneas periféricas e reticulócitos. contagem de células sanguíneas é realizada utilizando contagens em contador de células sanguíneas automática ADVIA.

Resultados e discussão

[00093] Uma única injeção subcutânea de 015-HH-EPO, EPO-HH-018, HH-EPO-018B, AF37702 todos significativamente elevam a contagem e percentagem de reticulócitos de sangue periférico em camundongo, em que os efeitos de 018B-HH-EPO são relativamente fortes, os efeitos de HH-018-EPO, AF37702 em seguida; e os efeitos de 015-HH-EPO é o mais fraco, os efeitos de 018-HH-EPO e AF37702 são aproximadamente iguais (ver Tabela 4). HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B e AF37702 elevam o hematócrito de célula do sangue periférico em camundongo, o conteúdo de hemoglobina. Seus efeitos são praticamente iguais, mas todos eles não têm influência significativa sobre a contagem de células sanguíneas vermelhas periféricas (Tabela 5).

[00094] Tabela 4: Efeitos de 015-HH-EPO, EPO-HH-018, HH-EPO-018B e AF37702 sobre a eritropoiese de reticulócitos do sangue periférico em camundongo

Grupo	Camundongo (número)	Dose e progra- mas	Eritropoiese de reticulose (x±SD)	Contagem de Eritropoiese de reticulose (×10 ⁹ /L,x±SD)
Controle	10	0,1%BSA em NS	2,8±1,0	195,±73,1
HH-EPO-015	10	2,5mg/kg,sc,d1	6,9±2,1**	511,9±191,7**
HH-EPO-015	10	5,0 mg/kg,sc,d1	8,9±2,4**	558,9±230,5**
HH-EPO-018	10	2,5mg/kg,sc,d1	16,2±3,5**	1137,3±240,2**
HH-EPO-018	10	5,0	16,0±3,2**	1113,2±210,7**
HH-EPO-018B	10	mg/kg,sc,d1	19,0±8,9**	1336,5±629,0**
HH-EPO-018B	10	2,5mg/kg,sc,d1		
HH-EPO-018B	10	5,0 mg/kg,sc,d1	20,0±5,3**	1440,3±416,5**

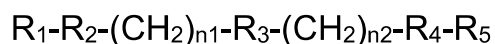
AF37702	10	2,5mg/kg,sc,d1	13,5±4,1**	865,2±291,4**
AF37702	10	5,0mg/kg,sc,d1	17,2±5,3**	1202,8±355,4**

[00095] Tabela 5: Efeitos de HH-015-EPO, EPO-HH-018, HH-EPO-018B e AF37702 em camundongo

grupo	Camundongo (número)	Dose e programas	Contagem de células sanguíneas vermelhas ($\times 10^6/\mu\text{L}, x \pm \text{SD}$)	Hematócritos de célula sanguínea ($\times 10^9/\text{L}, x \pm \text{SD}$)	hemoglobina (g/dL)
controle	10	0,1%BSA em NS	6,9±0,5	38,6±2,8	12,5±0,9
HH-EPO-015	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,5±0,3	42,7±1,8*	14,3±0,6**
HH-EPO-015	10	5,0 mg/kg,sc,d1	6,3±1,7	36,5±9,9	13,1±4,5
HH-EPO-018	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,0±0,3	40,6±1,6	13,3±2,2
HH-EPO-018	10	5,0 mg/kg,sc,d1	7,0±0,3	41,5±1,2*	14,2±0,8**
HH-EPO-018B	10	2,5mg/kg,sc,d1	6,6±1,4	39,0±7,7	14,2±0,6**
HH-EPO-018B	10	5,0 mg/kg,sc,d1	7,0±0,4	41,6±2,6*	14,4±0,9**
AF37702	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,1±0,4	41,9±3,1*	14,1±1,1**
AF37702	10	5,0mg/kg,sc,d1	7,2±0,3	42,5±3,4*	14,0±0,8**

REIVINDICAÇÕES

1. Derivado de peptídeo mimético de eritropoietina (EPO), caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula geral (I) e seus sais farmaceuticamente aceitáveis,



(I)

em que R_1 , R_5 são selecionados dentre peptídeos cíclicos tendo as sequências como segue:

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO: 5)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:6)

Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:7)

Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:8)

Ac-GGTYSKHFGPMTWVDRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:12)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:13)

Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:14)

Ac-GGTYSCHFGPITWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:15)

Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:16)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:17)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:18)

Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:19)

Ac-GGTYSKHFGSMTWVERPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:20)

Ac-GGTYSCHFGAMTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:23)

Ac-GGTYSCHFGAITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:24)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:25)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEQ ID NO:26)

Ac-GGTYSCHFGPLTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:29)

ou

Ac-GGTYS-Hoc-HFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:30);

em que n_1 , n_2 são números inteiros selecionados independentemente dentre 0 a 10;

R_2 , R_4 são selecionados dentre -CO ou -CH₂;

R_3 é selecionado dentre NCO(CH₂) _{n_4} NHR₆, CHOCONH(CH₂) _{n_5} NHR₆ ou CHSCON(CH₂) _{n_5} NHR₆,

n_4 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10,

n_5 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10,

e R_6 é selecionado dentre H ou derivados de metoxi polietilenoglicol.

2. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com a reivindicação 1, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que o N-terminal de R_1 , R_5 são acetilados.

3. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com a reivindicação 1 ou 2, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que R_1 , R_5 são peptídeos cíclicos ciclizados por ligações de dissulfeto.

4. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que R_1 , R_5 são separadamente selecionados dentre peptídeos cíclicos tendo as seguintes sequências:

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:5)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:6)

Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:7)

Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEQ ID NO:8)

5. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que o peptídeo mimético de EPO é selecionado dentre os seguintes peptídeos, em que

n_1, n_2 são 2, R_2, R_4 são $-CO$, R_3 é $CHOCONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, n_5 é 2;

n_1, n_2 são 1, R_2, R_4 são $-CO$, R_3 é $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, n_4 é 2;

n_1, n_2 são 2, R_2, R_4 são $-CH_2$, R_3 é $CHOCONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, n_5 é 2; ou

n_1, n_2 são 1, R_2, R_4 são $-CH_2$, R_3 é $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, n_4 é 2.

6. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que R_6 é H.

7. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que R_6 é derivados de metóxi polietileno glicol.

8. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com a reivindicação 7, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que o peso molecular dos derivados de metóxi polietileno glicol é selecionado dentre 5.000 a 100.000 daltons.

9. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com a reivindicação 7 ou 8, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que a estrutura de derivados de metóxi polietileno glicol é selecionada dentre o tipo ramificado ou linear.

10. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com a reivindicação 9, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que os derivados de metóxi polietileno glicol são de estrutura linear e têm peso molecular de 20.000 daltons, ou os derivados de metóxi polietileno glicol são estrutura linear e têm peso molecular de 40.000 daltons.

11. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que

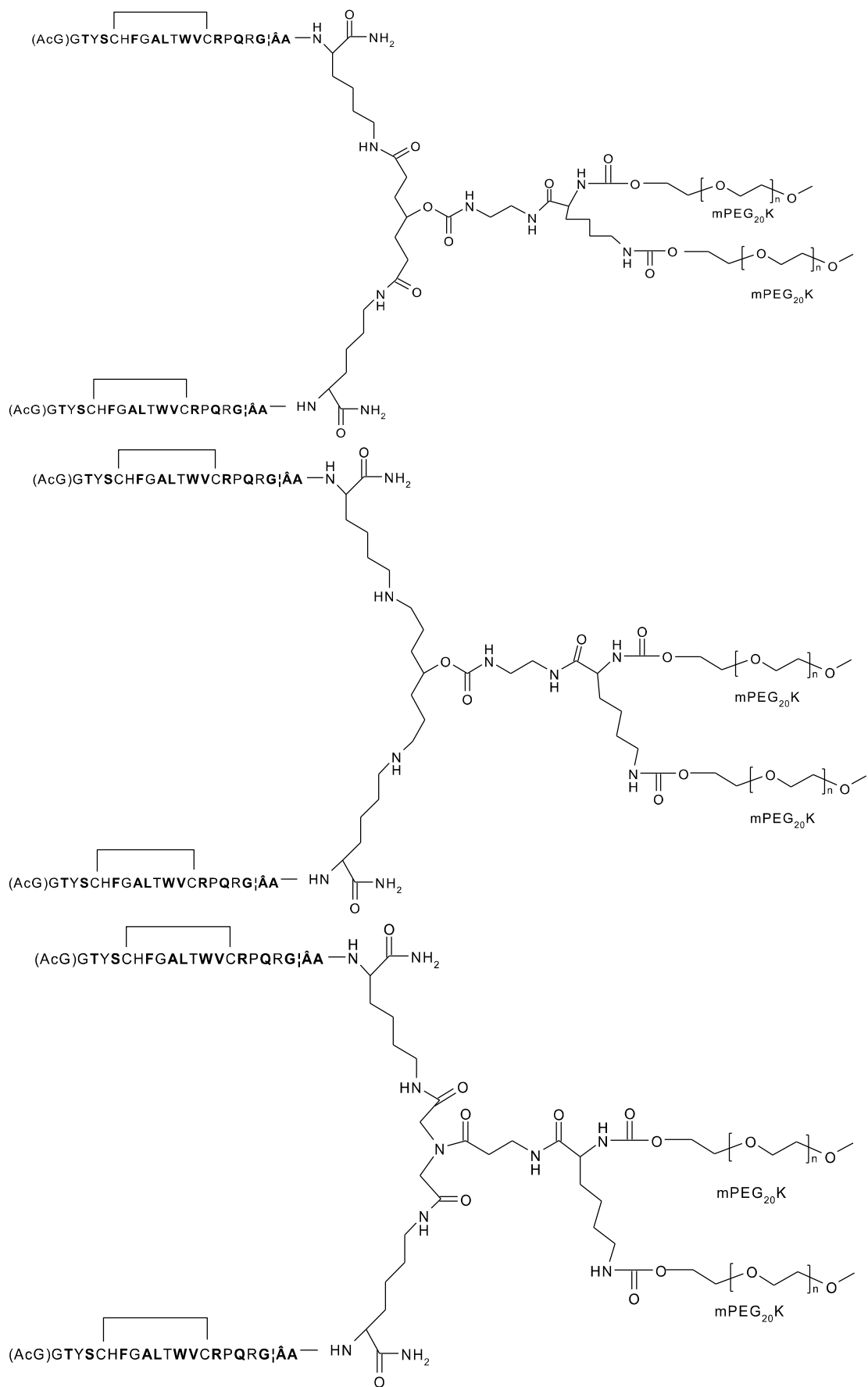
n_1, n_2 são 2, R_1, R_5 são selecionados dentre SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, R_2, R_4 são selecionados dentre -CO, -CH₂, R_3 é CHOCONH(CH₂) _{n_5} NHR₆, onde n_5 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, R_6 é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 20.000 daltons;

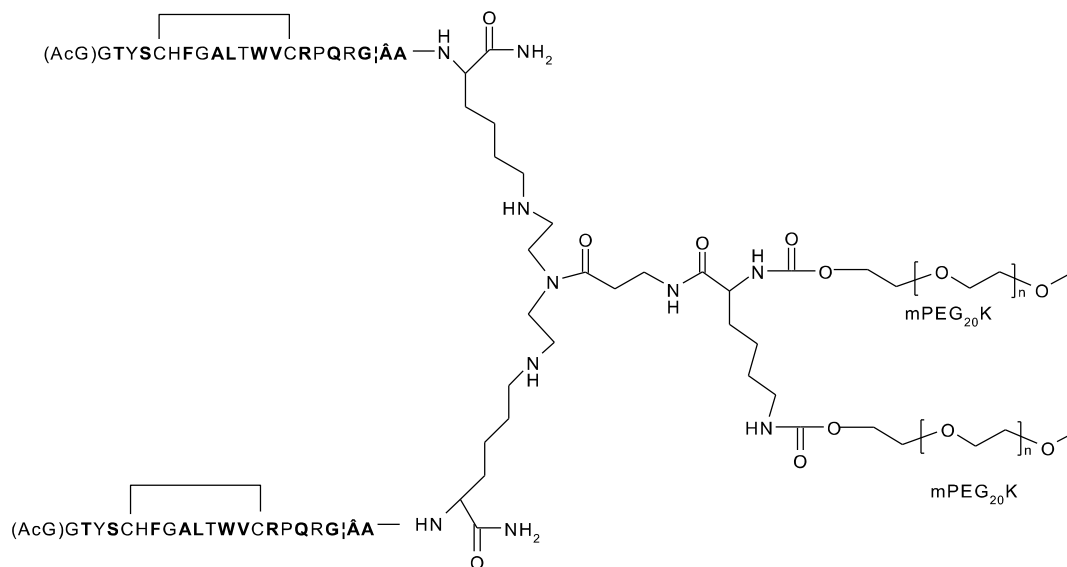
n_1, n_2 são 1, R_1, R_5 são selecionados dentre SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, R_2, R_4 são selecionados dentre -CO, -CH₂, R_3 é NCO(CH₂) _{n_4} NHR₆, onde n_4 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10 e, R_6 é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 20.000 daltons;

n_1, n_2 são 2, R_1, R_5 são selecionados dentre SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, R_2, R_4 são selecionados dentre -CO, -CH₂, R_3 é CHOCONH(CH₂) _{n_5} NHR₆, onde n_5 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10 e, R_6 é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 40.000 daltons; ou

n_1, n_2 são 1, R_1, R_5 são selecionados dentre SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, R_2, R_4 são selecionados dentre -CO, -CH₂, R_3 é NCO(CH₂) _{n_4} NHR₆, onde n_4 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10 e, R_6 é um derivado de metóxi polietileno glicol com estrutura linear e peso molecular de 40.000 daltons.

12. Derivado de peptídeo mimético de EPO de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado pelo fato de que o referido derivado de peptídeo mimético de EPO e seus sais farmacêuticamente aceitáveis são

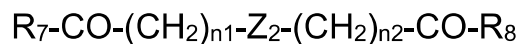




13. Método para preparação de derivado de peptídeo mimético de EPO, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(1) preparar R_1H , R_5H , em que R_1 , R_5 são selecionados dentre peptídeos cíclicos tendo as sequências de SEQ ID NOs: 5-8, SEQ ID NOs: 12-20, SEQ ID NOs: 23-26, SEQ ID NOs: 29-30;

(2) preparar pequena molécula funcional de fórmula geral (II)



(II)

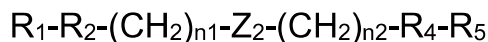
em que n_1 , n_2 são números inteiros independentemente selecionados dentre 0 a 10;

R_7 , R_8 são selecionados dentre OH ou H;

Z_2 é selecionado dentre $NCO(CH_2)_{n7}NHR_9$, $CHOCONH(CH_2)_{n8}NHR_9$, ou $CHSCON(CH_2)_{n8}NHR_9$, em que n_7 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, n_8 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, R_9 é selecionado dentre Boc ou CB_Z ,

(3) reagir R_1 , R_5 , com pequena molécula funcional de fórmula (II), através de amidação ou aminação reductiva para preparar o

composto de fórmula (III);



(III),

em que R_2 , R_4 são independentemente selecionados dentre -CO ou -CH₂,

(4) realizar reação de amidação com metóxi polietileno glicol ativo após Boc ou Cbz ser removido.

14. Método para preparação de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que na referida fórmula geral (II)

n_1 , n_2 são 1 ou 2, R_7 , R_8 são OH, Z_2 é selecionado dentre NCO(CH₂) _{n_7} NHR₉ ou CHOCONH(CH₂) _{n_8} NHR₉, n_7 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, n_8 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, R_9 é Boc; ou

n_1 , n_2 são 1 ou 2, R_7 , R_8 são H, Z_2 é selecionado dentre NCO(CH₂) _{n_7} NHR₉ ou CHOCONH(CH₂) _{n_8} NHR₉, n_7 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, n_8 é um número inteiro selecionado dentre 2 a 10, R_9 é Boc.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) o derivado de peptídeo mimético de EPO, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, e

(2) veículos farmaceuticamente aceitáveis.

16. Uso de derivados de peptídeo mimético de EPO, como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios definidos por um baixo nível de EPO ou grupo de células sanguíneas vermelhas insuficientes ou defectivas, em que os distúrbios definidos por um baixo nível de EPO ou grupo de células sanguíneas vermelhas

insuficientes ou defectivas são: insuficiência renal avançada ou diálise, anemia relacionada com a AIDS, doenças autoimunes ou tumor maligno, fibrose cística, anemia precoce, anemia relacionada à doença inflamatória crônica, lesão da medula óssea; perda aguda de sangue, envelhecimento e câncer com produção anormal de células sanguíneas vermelhas.

17. Uso de uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios definidos por um baixo nível de EPO ou grupo de células sanguíneas vermelhas insuficientes ou defectivas, em que os distúrbios definidos por um baixo nível de EPO ou grupo de células sanguíneas vermelhas insuficientes ou defectivas são: insuficiência renal avançada ou diálise, anemia relacionada com a AIDS, doenças autoimunes ou tumor maligno, fibrose cística, anemia precoce, anemia relacionada à doença inflamatória crônica, lesão da medula óssea; perda aguda de sangue, envelhecimento e câncer com produção anormal de células sanguíneas vermelhas.

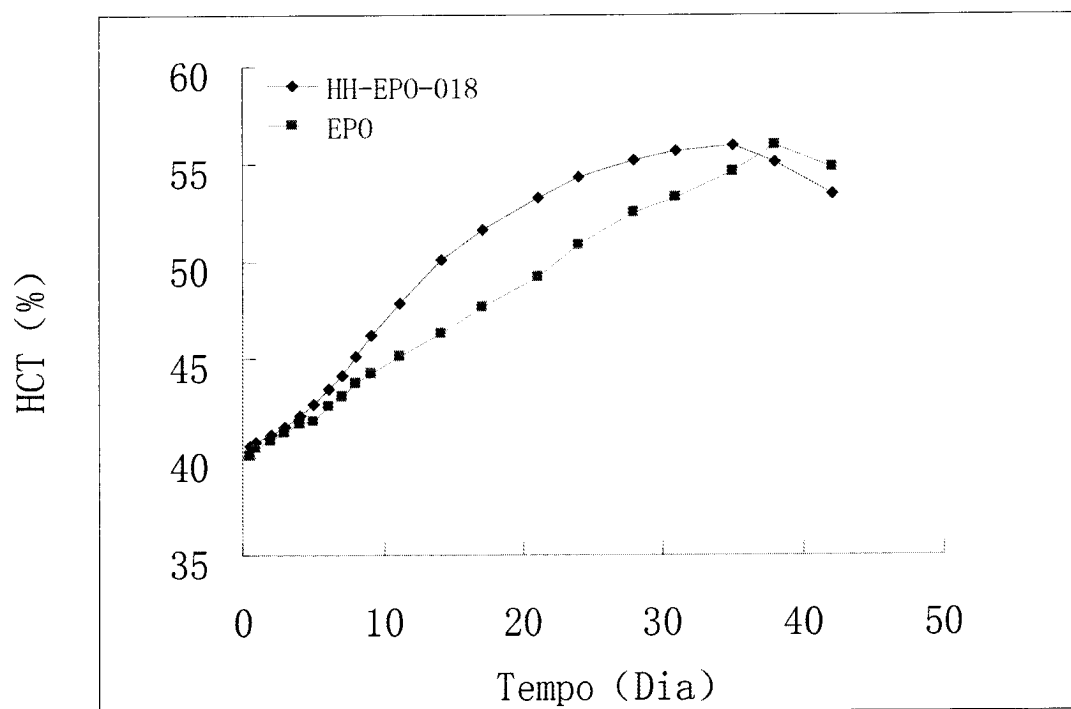


FIG. 1

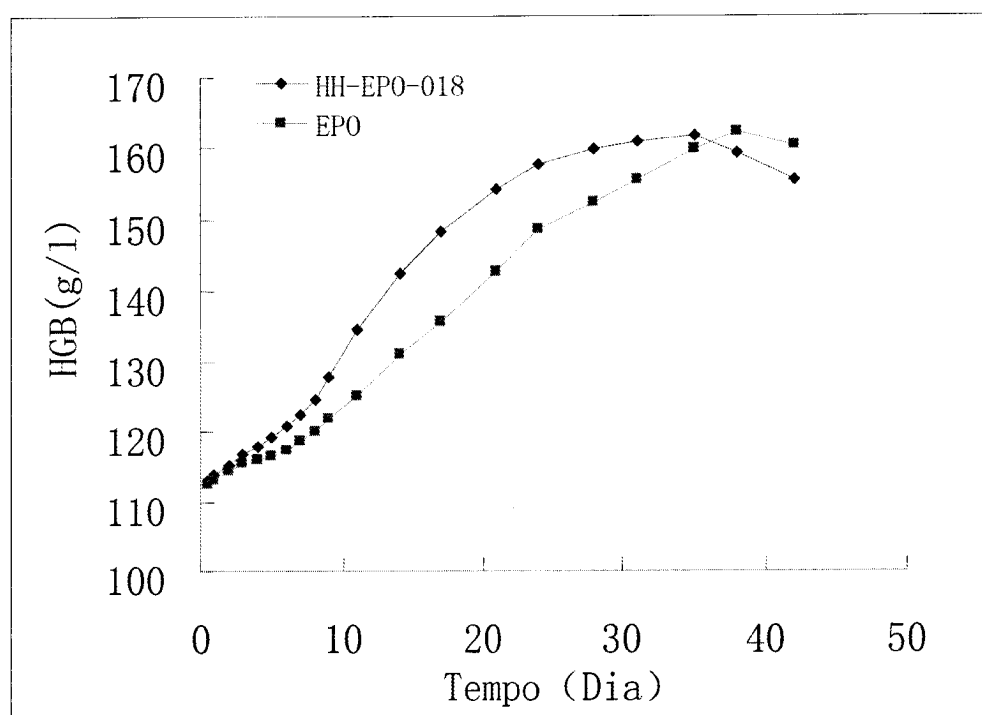


FIG. 2