

(11) Número de Publicação: **PT 1299348 E**

(51) Classificação Internacional:
C07C 233/00 (2007.10) **C07C 229/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.06.29**

(30) Prioridade(s): **2000.06.29 US 214893 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.04.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.04.09**
092/2008

(73) Titular(es):

EMISPHERE TECHNOLOGIES, INC.
240 CEDAR KNOLLS ROAD, SUITE 200 CEDAR
KNOLLS, NEW JERSEY 07927 US

(72) Inventor(es):

JOHN J. WEIDNER US
BRUCE F. VARIANO US
SHINGAI MAJURU US
SATEJ BHANKARKAR US
WILLIAM E. BAY US

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES ACTIVOS**

(57) Resumo:

RESUMO
"COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES
ACTIVOS"

São proporcionados compostos e composições para a administração de agentes activos. São também proporcionados métodos de administração e de preparação.

DESCRIÇÃO
"COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES
ACTIVOS"

A presente invenção refere-se a compostos para administração de agentes biologicamente activos a um alvo. Estes compostos são bem adequados à formação de misturas não covalentes com agentes activos para administração por via oral, intracolónica, pulmonar ou outras a animais. São também dados a conhecer métodos para a preparação e administração destas composições.

Frequentemente os meios para administração de agentes activos são gravemente limitados por barreiras biológicas, químicas e físicas. De modo típico, estas barreiras são impostas pelo ambiente através do qual a administração ocorre, do ambiente do alvo da administração e/ou do próprio alvo. Os agentes biológica e quimicamente activos são particularmente vulneráveis a estas barreiras.

Na administração de agentes farmacológicos e terapêuticos biologicamente activos e quimicamente activos a animais, são impostas barreiras pelo corpo. São exemplos de barreiras físicas a pele, bicamadas lipídicas e várias membranas dos órgãos que são relativamente impermeáveis a determinados agentes activos mas têm de ser atravessadas antes de alcançar o alvo, tal como o sistema circulatório. As barreiras químicas incluem, mas não se limitam a estas, variações de pH no tracto gastrointestinal (GI) e enzimas de degradação.

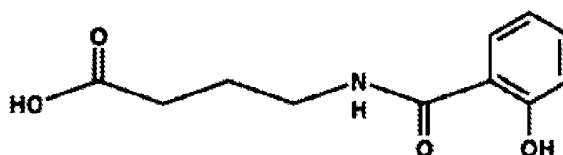
Estas barreiras são de significado particular na concepção de sistemas de administração oral. A administração oral de muitos agentes biologicamente ou quimicamente activos seria a via preferida para administração a animais, se não existissem as barreiras biológicas, químicas e físicas. Entre os numerosos agentes que não são tipicamente adequados para administração oral estão peptídeos biologicamente ou quimicamente activos, tais como calcitonina e insulina; polissacáridos e em particular mucopolissacáridos, incluindo, mas não limitados a estes, heparina; heparinóides; antibióticos e outras substâncias orgânicas. Estes agentes podem ser tornados rapidamente ineficazes ou podem ser destruídos no tracto gastrointestinal por hidrólise ácida, enzimas e semelhantes. Para além disso, a dimensão e a estrutura de fármacos macromoleculares pode impedir a absorção.

Os métodos mais antigos para administrar por via oral agentes farmacológicos vulneráveis têm-se baseado na co-administração de adjuvantes (por exemplo, resorcinóis e agentes tensioactivos não iónicos, tais como éter polioxietilénico e oleílico e éter n-hexadecílico e polietilénico) para aumentar artificialmente a permeabilidade das paredes intestinais, bem como a co-administração de inibidores enzimáticos (por exemplo, inibidores da tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFF) e trasilol) para inibir a degradação enzimática. Também têm sido descritos lipossomas como sistemas de administração de fármacos para a insulina e a heparina. No entanto, a utilização de amplo espectro destes sistemas de administração de fármacos é limitada porque: (1) os sistemas necessitam de quantidades tóxicas de adjuvantes ou de inibidores; (2) não estão disponíveis cargas, isto é,

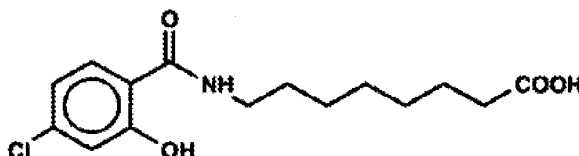
agentes activos, de baixo peso molecular; (3) os sistemas apresentam fraca estabilidade e um prazo de armazenagem inadequado; (4) os sistemas são de difícil preparação; (5) os sistemas não conseguem proteger o agente activo (carga); (6) os sistemas alteram de forma adversa o agente activo; ou (7) os sistemas não conseguem assegurar ou promover a absorção do agente activo.

Mais recentemente, têm sido utilizadas microesferas proteinóides para administrar fármacos. Por exemplo, ver US 5 401 516, US 5 443 841 e US RE35 862. Além disso, têm sido utilizados determinados ácidos aminados modificados para administrar fármacos. Ver, por exemplo, US 5 629 020; US 5 643 957; US 5 766 633; US 5 776 888; e US 5 866 536.

O documento WO 96/30036 dá a conhecer compostos e composições para a administração de agentes tais como o seguinte composto:

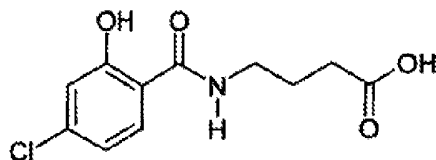


O documento WO 98/34632 dá a conhecer compostos e composições para a administração de agentes tais como o seguinte composto:



O problema que está na base da presente invenção é proporcionar um sistema simples e barato que seja facilmente preparado e que possa administrar uma ampla gama de agentes activos por várias vias.

O problema é solucionado por um composto da fórmula



Composto 1:

ou por um seu sal.

Numa outra forma de concretização, a presente invenção está direccionada para uma composição que compreende pelo menos um agente biologicamente activo e pelo menos um composto de entre o composto 1 ou um seu sal. São também proporcionados métodos para a preparação e administração destas composições.

São também proporcionadas formas unitárias de dosagem que compreendem estas composições. A forma unitária de dosagem pode apresentar-se a sob a forma de um sólido (tal como um comprimido, uma cápsula ou uma partícula tal como um pó ou uma saqueta) ou sob a forma de um líquido.

São também proporcionados métodos para a administração de um agente biologicamente activo a um animal que tenha necessidade do agente, em especial pelas vias oral, intracolónica ou pulmonar, com as composições da presente invenção, bem como métodos de tratamento utilizando estas composições. É proporcionado um método para o tratamento de uma doença num animal que compreende a administração de uma composição da presente invenção ao animal que tenha necessidade desta.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Compostos

Os compostos podem apresentar-se sob a forma de um ácido carboxílico e/ou dos seus sais. Os sais incluem, mas não são limitados a estes, sais orgânicos e inorgânicos, por exemplo sais de metais alcalinos, tais como de sódio, potássio e lítio; sais de metais alcalinoterrosos, tais como de magnésio, cálcio ou bário; sais de amónio; de ácidos aminados básicos tais como lisina ou arginina; e de aminas orgânicas, tais como dimetilamina ou piridina. De preferência os sais são sais de sódio. Os sais podem ser sais monovalentes ou multivalentes, tais como sais monossódicos e sais dissódicos. Os sais podem também ser solvatos incluindo solvatos de etanol.

Para além disso, podem ser utilizados poliacidos aminados e peptídeos que compreendem um ou mais destes compostos.

Um ácido aminado é qualquer ácido carboxílico que tem pelo menos um grupo amina livre e inclui ácidos aminados de ocorrência natural e sintéticos. Poliacidos aminados são quer peptídeos (que são dois ou mais ácidos aminados ligados por uma ligação peptídica) quer dois ou mais ácidos aminados ligados por uma ligação formada por outros grupos que podem, por exemplo, ligar-se por uma ligação de éster ou de anidrido. Os peptídeos podem variar em comprimento desde dipeptídeos com dois ácidos aminados até polipeptídeos com várias centenas de ácidos aminados. Um ou mais das unidades de ácidos aminados ou de peptídeos podem estar aciladas ou sulfonadas.

Os compostos aqui descritos podem ser derivados de ácidos aminados ou podem ser facilmente preparados a partir de ácidos aminados por métodos compreendidos na capacidade dos especialistas tendo em conta os presentes ensinamentos e os

métodos descritos em WO 96/30036, WO 97/36480, US 5 643 957 e US 5 650 386. Por exemplo, os compostos podem ser preparados fazendo reagir o ácido aminado isolado com o agente de acilação ou de modificação de amina apropriado, o qual reage com uma função amina presente no ácido aminado para formar amidas. Podem ser utilizados grupos protectores para evitar reacções secundárias indesejáveis como é sabido dos especialistas na matéria. Com respeito a grupos protectores, faz-se referência a T.W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Wiley, Nova Iorque (1981), cujos ensinamentos se dão como aqui reproduzidos por referência.

Podem ser preparados sais do presente composto por métodos conhecidos da técnica. Por exemplo, sais sódicos podem ser preparados por dissolução do composto em etanol e adição de hidróxido de sódio aquoso.

O composto pode ser purificado por recristalização ou por fraccionamento sobre um ou mais suportes cromatográficos sólidos, isoladamente ou ligados em série. Os sistemas de solventes de recristalização adequados incluem, mas não se limitam a estes, acetonitrilo, metanol e tetra-hidrofurano. O fraccionamento pode ser efectuado num suporte cromatográfico adequado, tal como alumina, utilizando misturas metanol/n-propanol como fase móvel; por cromatografia de fase invertida utilizando ácido trifluoroacético/acetonitrilo como fase móvel; e por cromatografia de permuta iónica utilizando água ou um tampão apropriado como fase móvel. Quando se realiza uma cromatografia de permuta aniónica, emprega-se de preferência um gradiente de cloreto de sódio de 0 a 500 mM.

De acordo com uma forma de concretização, o composto é empregue na sua forma anidra.

Agentes activos

Os agentes activos adequados para utilização na presente invenção são agentes biologicamente activos, incluindo, mas não se limitando a estes, pesticidas, agentes farmacológicos e agentes terapêuticos.

Por exemplo, os agentes biologicamente activos adequados para utilização na presente invenção incluem, mas não se limitam a estes, proteínas; polipeptídeos; peptídeos; hormonas; polissacáridos e particularmente misturas de mucopolissacáridos; hidratos de carbono; lípidos; outros compostos orgânicos; e em particular compostos que por si próprios não passam (ou em que apenas uma fracção da dose administrada passa) através da mucosa gastrointestinal e/ou são susceptíveis a degradação química por ácidos e enzimas no tracto gastrointestinal; ou qualquer combinação destes efeitos.

Exemplos adicionais incluem, mas não se limitam a estes, os seguintes, incluindo origens sintéticas, naturais ou recombinantes dos mesmos: hormonas do crescimento, incluindo hormonas de crescimento humanas (hGH), hormonas de crescimento humanas recombinantes (rhGH), hormonas de crescimento bovinas e hormonas de crescimento suínas; hormonas de libertação de hormona do crescimento; interferões, incluindo α , β e γ ; interleucina-1; interleucina-2; insulina, incluindo suína, bovina, humana e humana recombinante, opcionalmente tendo contra-íões incluindo de sódio, zinco, cálcio e amónio; factor de crescimento semelhante a insulina, incluindo IGF1;

heparina, incluindo heparina não fraccionada, heparinóides, dermatanos, condroitinas, heparina de baixo peso molecular, heparina de peso molecular muito baixo e heparina de peso molecular ultra baixo; calcitonina, incluindo de salmão, de enguia, de suíno e humana; eritropoietina; factor naturético atrial; antigénios; anticorpos monoclonais; somatostatina; inibidores de protease; adreno-corticotropina; hormona da libertação de gonadotropinas; oxitocina; hormona de libertação da hormona de luteinização; hormona estimuladora do folículo; glucocerebrosidase; trombopoietina; filgrastim; prostaglandinas; ciclosporina; vasopressina; cromolina sódica (cromoglicato sódico ou dissódico); vancomicina; desferrioxamina (DFO); hormona paratiróide (PTH), incluindo os seus fragmentos; agentes antimicrobianos, incluindo agentes antifúngicos, vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos ou derivados modificados por polietilenoglicol (PEG) destes compostos; ou qualquer combinação dos mesmos. Outras formas adequadas de insulina, incluindo, mas não se limitando a estas, formas sintéticas de insulina, estão descritas nas patentes US n.ºs 4.421.685, 5.474.978 e 5.534.488, que se dão todas como aqui reproduzidas na sua totalidade por referência.

Sistema de administração

As composições da presente invenção compreendem um agente de administração e um ou mais agentes activos. Numa forma de concretização, um ou mais dos compostos agentes de administração ou sais destes compostos ou poliacidos aminados ou peptídeos dos quais estes compostos ou sais formam uma ou mais das unidades, podem ser utilizados como um agente de administração por mistura com o agente activo antes da administração.

As composições para administração podem apresentar-se sob a forma de um líquido. O veículo de dosagem pode ser água (por exemplo, para calcitonina de salmão, hormona paratiróide e eritropoietina), propilenoglicol aquoso a 25% (por exemplo, para heparina) e tampão de fosfato (por exemplo, para rhGH). Outros veículos de dosagem incluem polietilenoglicóis, sorbitol, maltitol e sacarose. As soluções de dosagem podem ser preparadas por mistura de uma solução do composto agente de administração com uma solução do agente activo, logo antes da administração. Em alternativa, pode misturar-se uma solução do agente de administração (ou do agente activo) com a forma sólida do agente activo (ou do agente de administração). O composto agente de administração e o agente activo podem também ser misturados sob a forma de pós secos. O composto agente de administração e o agente activo podem também ser misturados durante o processo de preparação.

As soluções de dosagem podem opcionalmente conter aditivos tais como sais de tampão de fosfato, ácido cítrico, glicóis ou outros agentes de dispersão. Podem ser incorporados aditivos de estabilização na solução, de preferência a uma concentração entre os limites de cerca de 0,1 a 20% (p/v).

As composições de administração podem em alternativa apresentar-se sob a forma de um sólido, tal como um comprimido, uma cápsula ou uma partícula, tal como um pó ou uma saqueta. As formas de dosagem podem ser preparadas por mistura da forma sólida do composto com a forma sólida do agente activo. Em alternativa, um sólido pode ser obtido a partir de uma solução de composto e do agente activo por métodos conhecidos na técnica, tais como liofilização, precipitação, cristalização e dispersão de sólidos.

As composições para administração da presente invenção podem também incluir um ou mais inibidores de enzimas. Estes inibidores de enzimas incluem, mas não se limitam a estes, compostos tais como actinonina ou epiactinonina e seus derivados. Outros inibidores de enzimas incluem, mas não se limitam a estes, aprotinina (Trasylol) e inibidor de Bowman-Birk.

A quantidade de agente activo utilizado numa composição para administração da presente invenção é uma quantidade eficaz para alcançar o objectivo do agente activo particular para a indicação do alvo. A quantidade de agente activo nas composições é de modo típico uma quantidade eficaz sob os aspectos farmacológico, biológico e terapêutico. No entanto, a quantidade pode ser menos do que esta quantidade quando a composição é utilizada numa forma unitária de dosagem, porque a forma unitária de dosagem pode conter várias composições de composto/agente activo ou pode conter uma quantidade eficaz sob os aspectos farmacológico, biológico ou terapêutico dividida. A quantidade eficaz total pode então ser administrada em unidades cumulativas que contêm, no total, uma quantidade eficaz do agente activo.

A quantidade total do agente activo a ser utilizada pode ser determinada por métodos conhecidos dos especialistas na matéria. No entanto, uma vez que as composições podem administrar agentes activos mais eficazmente do que as composições da técnica anterior, podem ser administradas ao sujeito quantidades inferiores de agentes biologicamente activos do que as utilizadas nas formas unitárias de dosagem ou nos sistemas de administração da técnica

anterior, alcançando ainda os mesmos níveis sanguíneos e/ou efeitos terapêuticos.

Os compostos agora dados a conhecer administram agentes biologicamente activos, em particular nos sistemas oral, intranasal, sublingual, intraduodenal, subcutâneo, bucal, intracolónico, rectal, vaginal, mucosal, pulmonar, transdérmico, intradérmico, parentérico, intravenoso, intramuscular e ocular, bem como no atravessamento da barreira sangue-cérebro.

As formas unitárias de dosagem podem também incluir qualquer excipiente, diluente, desintegrante, lubrificante, plastificante, corante, agente de mascarar sabor, açúcares, edulcorantes, sais e veículos de doseamento ou uma combinação destes, incluindo, mas não se limitando a estes, água, 1,2-propanodiol, etanol, azeite ou qualquer combinação destes.

Os compostos e as composições da presente invenção são úteis para a administração de agentes biologicamente activos a quaisquer animais, incluindo, mas não se limitando a estes, aves, tais como galinhas; mamíferos, tais como roedores, vacas, suínos, cães, gatos, primatas e particularmente humanos; e insectos.

O sistema é particularmente vantajoso para administrar agentes biologicamente activos que de contrário seriam destruídos ou tornados menos eficazes por condições encontradas antes de o agente activo alcançar a sua zona alvo (isto é, a área na qual o agente activo da composição administrada deve ser libertado) e no interior do corpo do animal a que é administrado. Em particular, os compostos e

composições da presente invenção são úteis em agentes activos para administração oral, em especial nos que não são normalmente administrados oralmente ou nos em que se pretende uma administração melhorada.

As composições que compreendem os compostos como agentes activos têm utilidade na administração de agentes activos a sistemas biológicos seleccionados e numa biodisponibilidade aumentada ou melhorada do agente activo em comparação com a administração do agente activo sem o agente de administração. A administração pode ser melhorada por administração de mais agente activo durante um período de tempo ou na administração do agente activo num período de tempo em particular (tal como para conseguir uma administração mais rápida ou retardada) ou durante um período de tempo (tal como administração uniforme).

A seguir à administração, o agente activo presente na composição ou na forma unitária de dosagem é integrado na circulação. A biodisponibilidade do agente é facilmente avaliada por medição de uma actividade farmacológica conhecida no sangue, por exemplo um aumento do tempo de coagulação sanguínea causado pela heparina ou uma diminuição nos níveis de cálcio em circulação causada pela calcitonina. Em alternativa, podem ser medidos directamente os níveis em circulação do próprio agente activo.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE CONCRETIZAÇÃO PREFERIDAS

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção sem a limitarem. Todas as partes são dadas em peso sempre que nada em contrário seja indicado.

Exemplo 1 - Preparação dos compostos**1a. Preparação do composto 1.**

Adicionou-se ácido 4-clorosalicílico (10,0 g, 0,0579 mol) a um balão de uma tubuladura de 250 mL de fundo redondo que continha cerca de 50 mL de cloreto de metileno. Iniciou-se a agitação e continuou-se durante o resto da reacção. Adicionou-se ao balão o agente de acoplamento 1,1-carbonildiimidazole (9,39 g, 0,0579 mol) sob a forma de um sólido em porções. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos depois de ter sido adicionado todo o agente de acoplamento e em seguida adicionou-se ao balão cloridrato de 4-aminobutirato de etilo (9,7 g, 0,0579 mol) com agitação. Adicionou-se gota a gota trietilamina (10,49 mL, 0,0752 mol) de um funil de adição. O funil de adição foi passado com cloreto de metileno. A mistura reaccional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente de um dia para o outro.

A mistura reaccional foi vertida para uma ampola de decantação e foi lavada com HCl 2 N, tendo-se formado uma emulsão. Deixou-se a emulsão em repouso durante dois dias. Em seguida, filtrou-se a emulsão através de celite num funil de vidro poroso. O filtrado foi deitado novamente numa ampola de decantação a fim de separar as camadas. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, que foi em seguida separado por filtração e o filtrado foi concentrado por evaporação em evaporador rotativo. O material sólido resultante foi hidrolisado com NaOH 2 N, guardado de um dia para o outro no frigorífico e em seguida retomou-se a hidrólise. A solução foi acidificada com HCl 2 N e os sólidos que se formaram foram isolados, secos sob vácuo e recristalizados duas vezes utilizando metanol/água. Durante a noite precipitaram sólidos que foram isolados e secos. Os

sólidos foram dissolvidos em NaOH 2 N e o pH da amostra foi ajustado a pH 5 com HCl 2 N. Os sólidos foram isolados e por HPLC apresentaram um único pico. Estes sólidos foram em seguida recristalizados em metanol/água, foram isolados e em seguida secos sob vácuo, obtendo-se 4,96 g (33,0%) de ácido 4-(4-cloro-2-hidroxibenzoíl)aminobutírico. ($C_{11}H_{12}ClNO_4$; peso molecular 257,67.) Ponto de fusão 131-133 °C. Análise por combustão: %C: 51,27 (calc.), 51,27 (determinado); %H: 4,69 (calc.), 4,55 (determinado); %N: 5,44 (calc.), 5,30 (determinado). Análise por H RMN: (d_6 -DMSO): δ 13,0, s, 1H (COOH); δ 12,1, s, 1H (OH); δ 8,9, t, 1H (NH); δ 7,86, d, 1H (H orto em relação à amida); δ 6,98, d, 1H (H orto em relação ao fenol OH); δ 6,96, d, 1H, (H meta em relação à amida); δ 3,33, m, 2H (CH_2 adjacente a NH); δ 2,28, t, 2H (CH_2 adjacente a COOH); δ 1,80, m, 2H (CH_2 alifático beta em relação a NH e CH_2 beta em relação a COOH).

1b. Preparação adicional do composto 1.

Adicionou-se ácido 4-clorosalicílico (25,0g, 0,1448 mol) a um balão de uma tubuladura de 250 mL de fundo redondo que continha cerca de 75 a 100 mL de cloreto de metileno. Iniciou-se a agitação e continuou-se para o resto da reação. Adicionou-se ao balão o agente de acoplamento 1,1-carbonildiimidazole (23,5g, 0,1448 mol) sob a forma de um sólido em porções. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos depois de ter sido adicionado todo o agente de acoplamento e em seguida adicionou-se ao balão cloridrato de 4-aminobutirato de etilo (24,3 g, 0,1448 mol) com agitação. Adicionou-se gota a gota trietilamina (26,0 mL, 0,18824 mol) de um funil de adição. O funil de adição foi passado

com cloreto de metileno. A mistura reaccional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente de um dia para o outro.

A mistura reaccional foi vertida para uma ampola de decantação e foi lavada com HCl 2 N, tendo-se formado uma emulsão. Filtrou-se a emulsão através de celite num funil de vidro poroso. O filtrado foi deitado novamente numa ampola de decantação a fim de separar as camadas. A camada orgânica foi lavada com água e salmoura e em seguida seca sobre sulfato de sódio, que foi em seguida separado por filtração e o filtrado foi concentrado por evaporação em evaporador rotativo. O material sólido resultante foi hidrolisado com NaOH 2 N de um dia para o outro. A solução foi acidificada com HCl 2 N e os sólidos castanhos que se formaram foram recristalizados utilizando metanol/água e o material negro insolúvel foi separado por filtração a quente. Precipitaram sólidos brancos que foram isolados e secos, obtendo-se 11,68 g (37,0%) de ácido 4-(4-cloro-2-hidroxibenzoí)aminobutírico. ($C_{11}H_{12}ClNO_4$; peso molecular 257,67.) Ponto de fusão 129-133 °C. Análise por combustão: %C: 51,27 (calc.), 51,26 (determinado); %H: 4,69 (calc.), 4,75 (determinado); %N: 5,44 (calc.), 5,32 (determinado). Análise por H RMN: (d_6 -DMSO): δ 13,0, s, 1H (COOH); δ 12,1, s, 1H (OH); δ 8,9, t, 1H (NH); δ 7,86, d, 1H (H orto em relação à amida); δ 6,98, d, 1H (H orto em relação ao fenol OH); δ 6,96, d, 1H, (H meta em relação à amida); δ 3,33, m, 2H (CH_2 adjacente a NH); δ 2,28, t, 2H (CH_2 adjacente a COOH); δ 1,80, m, 2H (CH_2 alifático beta em relação a NH e CH_2 beta em relação a COOH).

1c. Preparação adicional do composto 1

Ácido 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanóico

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, uma trapa de Dean-Stark de 1 L com condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e manta de aquecimento. A reacção subsequente foi efectuada sob uma atmosfera de azoto seco. Carregou-se como reagente n-butanol (5000 mL) e ácido 4-clorossalicílico (2000 g, 11,59 mol) no balão de reacção. A trapa de Dean-Stark foi cheia com n-butanol (1000 mL). Adicionou-se ácido sulfúrico concentrado (50 g). A mistura reaccional foi aquecida até refluxo durante aproximadamente 120 horas. Recolheram-se na trapa aproximadamente 206 mL de água durante este período. A manta de aquecimento foi retirada e a mistura reaccional foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A trapa de Dean-Stark foi drenada e retirada. Carregou-se água desionizada (1000 mL). A mistura bifásica foi agitada durante 10 minutos. A agitação foi parada e as fases foram deixadas separar. A fase aquosa inferior foi retirada por sifonagem e desprezada. Carregou-se na mistura reaccional uma solução aquosa a 10 % em peso de bicarbonato de sódio (1000 mL). A mistura foi agitada durante 10 minutos. A mistura reaccional foi analisada com papel de pH para verificar que o pH da solução era superior a 7. Adicionou-se água (500 mL) à mistura reaccional. Parou-se a agitação e as fases foram deixadas separar. A camada aquosa inferior foi retirada por sifonagem e desprezada. A mistura reaccional foi lavada com uma nova porção de 500 mL de água desionizada. O reactor foi preparado para destilação atmosférica para um balão tarado de 5 L. A mistura foi destilada até que a temperatura no balão aumentou para entre 140 e 150 °C. A destilação foi mudada de destilação atmosférica para destilação sob vácuo. A pressão no passo de destilação foi lentamente reduzida até 100 mm de Hg. A temperatura do balão diminuiu e

eliminaram-se por destilação o n-butanol restante e o éter n-butílico (um produto secundário da reacção). O aquecimento foi parado e a mistura reaccional foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. O vácuo foi desfeito com azoto seco. O éster butílico bruto foi transferido para um balão de 5 L de um conjunto de destilação sob vácuo. O éster butílico bruto foi destilado a uma pressão entre 0,2 e 0,5 mm de Hg. A cabeça da destilação recolhida a uma temperatura < 40 °C foi desprezada. A fracção de 4-cloro-2-hidroxibenzoato de butilo foi recolhida a uma temperatura na cabeça do condensador entre 104 e 112 °C. Esta fracção tinha um peso de 2559 g. O rendimento foi de 96%.

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e uma manta de aquecimento. O reactor foi purgado com azoto. Carregaram-se no balão de reacção 4-cloro-2-hidroxibenzoato de butilo (2559 g, 11,2 moles) e metanol reagente (10 000 mL) e agitou-se o conteúdo até se obter uma solução. A mistura reaccional foi filtrada através de um funil de Büchner e voltada a carregar no reactor. Aumentou-se a velocidade de agitação e adicionou-se rapidamente amoníaco gasoso para o espaço superior do reactor. A adição de gás amoníaco foi continuada até a temperatura do reactor alcançar 45 °C. A adição do amoníaco foi suspensa e a velocidade de agitação foi reduzida. A mistura reaccional foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A adição de gás amoníaco, conforme descrito acima, foi repetida até a reacção estar completa, conforme indicado por cromatografia líquida. Foram necessárias sete cargas de amoníaco ao longo de cinco dias para completar a reacção. Removeu-se aproximadamente metade do solvente por destilação atmosférica. A mistura

reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionaram-se 5 L de água desionizada. Adicionou-se ácido clorídrico concentrado (aproximadamente 500 mL) lentamente ao reactor até o pH da mistura reaccional se situar entre 4 e 5. O precipitado resultante foi recolhido por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso de grande diâmetro. O produto bolo de filtração foi lavado com 2000 mL de água desionizada e seco a 50 °C durante 32 horas, tendo-se obtido 1797 g de 4-cloro-2-hidroxibenzamida. O rendimento foi de 94%.

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, funil de adição, leitura de temperatura por termopar e uma manta de aquecimento. O reactor foi purgado com azoto. Carregaram-se no balão de reacção acetonitrilo (4700 mL) e 4-cloro-2-hidroxibenzamida (1782 g, 10,4 mol) e deu-se início à agitação. Carregou-se no reactor piridina (1133 mL, 14,0 mol). A pasta resultante da reacção foi arrefecida até menos de 10 °C com um banho de gelo. Colocou-se no funil de adição cloroformiato de etilo (1091 mL, 1237 g, 11,4 mol) e carregou-se lentamente à mistura reaccional agitada de modo que a temperatura da mistura reaccional não ultrapassasse 15 °C durante a adição. A temperatura da mistura reaccional foi mantida entre 10 e 15 °C durante 30 minutos após a adição de cloroformiato de etilo estar completa. O banho de gelo foi retirado e a mistura reaccional foi aquecida até à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi em seguida aquecida lentamente até refluxo e mantida a esta temperatura durante 18 horas. Por análise de cromatografia líquida da mistura reaccional verificou-se que a reacção só estava completa a 80%. Removeu-se aproximadamente metade do solvente por

destilação atmosférica. A mistura reaccional foi arrefecida primeiro até à temperatura ambiente e em seguida a $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um banho de gelo. Adicionou-se mais piridina (215 mL, 2,65 mol) à mistura reaccional. Adicionou-se lentamente através do funil de adição cloroformiato de etilo (235 g, 2,17 mol) à mistura reaccional fria. A mistura reaccional foi mantida entre 10 e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos após a adição de cloroformiato de etilo estar completa. O banho de gelo foi retirado e a mistura reaccional foi aquecida até à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi então aquecida lentamente até refluxo e mantida a esta temperatura durante 18 horas, depois do que se verificou por análise de cromatografia líquida que a reacção estava completa. A mistura reaccional foi arrefecida primeiro até à temperatura ambiente e em seguida a $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um banho de gelo. Adicionou-se água (1600 mL) lentamente através de um funil de adição e a pasta resultante foi mantida a $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 minutos. O produto sólido foi recolhido por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso de grande diâmetro. O produto no bolo do filtro foi lavado com água desionizada e seco sob vácuo a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas, tendo-se obtido 1914 g de 7-cloro-2H-1,3-benzoxazina-2,4(3H)-diona sob a forma de um sólido castanho amarelado. O rendimento foi de 83%.

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e manta de aquecimento. A reacção subsequente foi efectuada sob uma atmosfera de azoto seco. Carregaram-se sob uma purga de azoto 7-cloro-2H-1,3-benzoxazina-2,4(3H)-diona (1904 g, 9,64 mol), 4-bromobutirato de etilo (1313 mL, 9,18 mol) e N,N-dimetilacetamida (4700 mL). A mistura reaccional foi

aquecida até 70 °C. Carregou-se carbonato de sódio (1119 g, 10,55 mol) para a solução límpida em cinco porções iguais ao longo de aproximadamente 40 minutos. A mistura reaccional foi mantida a 70 °C de um dia para o outro. A mistura reaccional foi arrefecida a 55 °C. Os sólidos inorgânicos foram removidos por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso. O balão de reacção foi lavado com 2B-etanol (2000 mL) e o líquido de lavagem foi utilizado para lavar o bolo do filtro. O balão de reacção foi limpo com água desionizada. O filtrado foi voltado a carregar no balão de reacção limpo. O filtrado foi arrefecido num banho de gelo. Adicionou-se lentamente água desionizada (9400 mL) com um funil de adição. A mistura fria foi deixada em agitação de um dia para o outro. Os sólidos resultantes foram recolhidos por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso. O bolo obtido foi lavado com água desionizada. A 3-(4-butanoato)-7-cloro-2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona de etilo tinha um peso de 2476,0 g. O rendimento foi de 82,2%.

Equipou-se um reactor de aço inoxidável de 12 L com um agitador superior, condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar, funil de adição e manta de aquecimento. A reacção subsequente foi efectuada sob uma atmosfera de azoto seco. Carregaram-se no reactor água (3 L) e 3-(4-butanoato)-7-cloro-2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona de etilo (1118 g, 3,58 mol) e deu-se início à agitação. Adicionou-se lentamente à pasta de reacção uma solução de hidróxido de sódio (574 g, 14,34 mol) em água (2 L). A mistura reaccional foi aquecida a 70 °C durante 6 horas e em seguida deixada arrefecer lentamente até à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi filtrada através de um funil de Büchner.

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e um funil de adição. Carregaram-se no reactor água desionizada (1880 mL) e ácido clorídrico concentrado (1197 g, 12,04 mol). O produto hidrolisado resultante foi adicionado lentamente por meio de um funil de adição à solução ácida. O pH da pasta resultante foi ajustado a 3 por adição de mais ácido clorídrico (160 mL, 1,61 mol). Os sólidos obtidos foram recolhidos por filtração através de um funil de vidro poroso e secos numa estufa de vácuo a 50 °C durante 24 horas, tendo-se obtido 1109,3 g de ácido 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanóico sob a forma de um sólido quase branco. O rendimento foi quantitativo.

EXEMPLO 1d: Preparação de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)-amino]butanoato de sódio anidro

Equipou-se um balão de 22 L de fundo redondo, de cinco tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e manta de aquecimento. A reacção subsequente foi efectuada sob uma atmosfera de azoto seco. Carregaram-se no reactor acetona reagente (13 000 mL) e ácido 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)-amino]butanóico (500,0 g, 1,94 mol) e deu-se início à agitação. A pasta de reacção foi aquecida a 50 °C até se obter uma solução turva castanha. A solução quente foi bombeada através de um filtro de pressão quente preparado com papel de filtro Whatman n.º 1 para um reactor de 22 L limpo. O filtrado amarelo límpido foi aquecido até 50 °C com agitação. Carregou-se no reactor uma solução de hidróxido de sódio (aquosa a 50%; 155 g, 1,94 mol) mantendo-se uma agitação vigorosa. Depois de a adição de base estar completa, o reactor foi aquecido a refluxo

(60 °C) durante 2,5 horas e em seguida deixado arrefecer lentamente até à temperatura ambiente. O produto foi isolado por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso e seco numa estufa de vácuo a 50 °C durante 24 horas, tendo-se obtido 527,3 g de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanoato de sódio sob a forma de um sólido quase branco. O rendimento foi de 97,2%.

EXEMPLO 1e: Preparação de um 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanoato de sódio mono-hidrato canal hidrato

Equipou-se um balão de 22 L com um agitador superior. Adicionaram-se água desionizada (2000 mL) e ácido 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanóico (380,0 g, 1,47 mol) e deu-se início à agitação. Adicionou-se ao reactor uma solução de hidróxido de sódio (59,0 g, 1,48 mol) em água (500 L). Adicionou-se ao reactor água (1500 mL) e aqueceu-se a pasta resultante até se obter uma solução completa. A mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e em seguida concentrada à secura sob pressão reduzida. Os sólidos resultantes foram raspados do balão e secos sob vácuo a 50 °C, tendo-se obtido 401,2 g de um hidrato canal de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)-amino]-butanoato de sódio sob a forma de um sólido quase branco. O rendimento foi de 96,9%.

EXEMPLO 1f: Preparação de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoí)amino]butanoato de sódio através do solvato de isopropanol

Equipou-se um balão de um litro de fundo redondo, de quatro tubuladuras com um agitador superior, um condensador de refluxo, leitura de temperatura por termopar e manta de aquecimento. A reacção subsequente foi efectuada sob uma atmosfera de azoto seco. Carregaram-se no reactor

isopropanol (400 mL) e ácido 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoíl)-amino]butanóico (25,0 g, 0,09 mol) e deu-se início à agitação. A pasta de reacção foi aquecida a 50 °C até se obter uma solução turva castanha. A solução quente foi filtrada através de um filtro de pressão quente preparado com papel de filtro Whatman n.º 1 para um reactor de 1 L limpo. O filtrado amarelo límpido foi aquecido até 62 °C com agitação. Carregou-se no reactor uma solução de hidróxido de sódio (aquosa a 50%; 7,2 g, 0,09 mol) mantendo-se uma agitação vigorosa. Depois de a adição de base estar completa, o reactor foi aquecido a refluxo (72 °C) e em seguida deixado arrefecer lentamente até à temperatura ambiente. O produto foi isolado por filtração sob vácuo através de um funil de vidro poroso e seco sob vácuo a 50 °C durante 24 horas, tendo-se obtido 23,16 g de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoíl)amino]butanoato de sódio sob a forma de um sólido quase branco. O rendimento foi de 92%.

Exemplo 1g. Preparação de cápsulas

Prepararam-se cápsulas para dosagem para primatas contendo o sal monossódico do composto 1 (conforme preparado no exemplo 1d) e insulina do modo seguinte. Peneiraram-se em primeiro lugar o sal monossódico do composto 1 e cristais de insulina zinco humana QA307X: proinsulina derivada (de origem de ADN recombinante) (adquirida a Eli-Lilly & Co. de Indianapolis, IN) através de um tamis Tyler normalizado de 35 malhas e pesou-se a quantidade necessária. O sal monossódico do composto 1 e a insulina peneirados foram misturados utilizando o método de peneiração geométrico num almofariz de vidro de dimensão adequada. Os materiais no almofariz foram bem misturados com uma mão de almofariz de vidro. Utilizou-se uma espátula para raspar as paredes do almofariz. A formulação resultante foi transferida para um

barco de pesagem de plástico para enchimento de cápsulas. A formulação foi embalada à mão em cápsulas de gelatina dura Torpac de dimensão n.º 0 (adquiridas a Torpac, Inc. de Fairfield, NJ). O peso de enchimento de cada cápsula dependia do peso de cada animal. As doses do composto 1 nas cápsulas eram 100 mg/kg, 75 mg/kg e 50 mg/kg (sob a forma de sal monossódico). As doses de insulina nas cápsulas eram de 0,25 a 0,5 mg por kg.

Exemplo 2 - Insulina - Administração oral

A. Estudos em ratos Prepararam-se em água desionizada composições de dosagens orais (PO) do composto agente de administração (preparado de acordo com o Exemplo 1a ou 1b conforme indicado adiante) e insulina zinco recombinante humana (adquirida a Calbiochem- Novabiochem Corp., La Jolla, CA (n.º de catálogo 407694)). Tipicamente adicionaram-se 500 mg do composto agente de administração a 1,5 mL de água. Converteu-se o ácido livre do composto agente de administração no sal sódico por agitação da solução resultante e adição de um equivalente de hidróxido de sódio. A solução foi agitada num vortex e em seguida aquecida (cerca de 37 °C) e tratada com ultra-sons. Ajustou-se o pH a cerca de 7 a 8,5 com NaOH ou HCl. Adicionou-se mais NaOH se necessário para conseguir uma solubilidade uniforme e o pH foi reajustado. (Por exemplo, para o composto 1a, adicionou-se um total de 258,5 mL de NaOH 10 N a 501 mg de composto em 1,5 mL de água, pH final 7,73.) Adicionou-se em seguida água para levar o volume total a cerca de 2,4 mL e agitou-se num vortex. Adicionou-se à solução cerca de 1,25 mg de insulina a partir de uma solução mãe de insulina (15 mg/mL preparada a partir de 0,5409 g de insulina e 18 mL de água desionizada, ajuste com HCl e NaOH a pH 8,15 e para obter uma solução límpida

utilizando 40 mL de HCl concentrado, 25 mL de NaOH 10 N e 50 mL de NaOH 1 N) e misturou-se por inversão. A dose do composto agente de administração, a dose de insulina e as quantidades em volume finais são dadas seguidamente no Quadro 1.

Os protocolos de dosagem e de amostragem foram os seguintes. Mantiveram-se em jejum durante 24 horas ratos Sprague-Dawley machos de peso entre cerca de 200 e 250 g e administrou-se cetamina (44 mg/kg) e cloropromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da dose e depois conforme necessário para manter a anestesia. Administrou-se a um grupo de cinco animais uma das soluções de doseamento. Para dosagem oral, adaptou-se um cateter francês Rusch 8 de 11 cm a uma seringa de 1 mL com uma ponta de pipeta. Encheu-se a seringa com a solução de dosagem aspirando a solução através do cateter, o qual foi em seguida limpo até estar seco. O cateter foi enfiado no esófago, deixando 1 cm de tubo depois da incisão. Administrou-se a solução pressionando o êmbolo da seringa.

Recolheram-se amostras de sangue em série da artéria caudal, tipicamente nos momentos = 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após a administração. Determinaram-se os níveis de insulina no soro com um Insulin ELISA Test Kit (Kit n.º DSL-10-1600 de Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX), modificando o protocolo normal a fim de otimizar a sensibilidade e o intervalo linear da curva normal para os volumes e as concentrações das amostras utilizadas no presente protocolo. Mediram-se as concentrações de insulina humana no soro ($\mu\text{U/mL}$) para cada instante para cada um dos cinco animais em cada grupo de dosagem. Determinou-se a média dos cinco valores para cada

instante e inscreveram-se os resultados como concentração de insulina no soro em função do tempo. No Quadro 1 seguinte apresentam-se o máximo (pico) e a área sob a curva (ASC). Por meio de experiências anteriores verificou-se que não eram mensuráveis os níveis de insulina humana a seguir à administração oral doseada com insulina humana isolada.

Quadro 1 - Insulina - Administração oral

Composto	dose em volume (mL/kg)	Dose do composto (mg/kg)	Dose de insulina (mg/kg)	Pico médio no soro Insulina humana ($\mu\text{U/mL} \pm \text{DP}$)	ASC
1a	1,0	200	0,5	1457 $\pm$ 268	58935
1b	1,0	200	0,5	183 $\pm$ 89	8674
1b	1,0	200	0,5	136 $\pm$ 52	5533
1b	1,0	200	0,5	205 $\pm$ 61	7996
1b	1,0	200	0,5	139 $\pm$ 43	5271

B. Estudos em símios

Todos os protocolos animais respeitavam os "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" e foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC).

O protocolo de dosagem para administração de cápsulas a cada animal foi como se segue. Foram obtidas amostras de plasma de linha de base dos animais antes da administração das doses. Mantiveram-se grupos de quatro símios cinomolgus, dois machos e duas fêmeas, com pesos de 2 a 3 kg em jejum durante 4 horas antes da administração das doses e até 2 horas depois de cada administração. Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 10 mg/kg de cloridrato de cetamina imediatamente antes da administração da dosagem. A cada animal foram administradas várias doses de composto 1 (25 a 100 mg/kg) em combinação com várias doses de insulina 0,25 a 0,5 mg/kg

de insulina em 1 cápsula. Manteve-se o acesso a água no decurso do período de administração das doses e deram-se 400 mL de sumo ao animal durante a noite anterior e no decurso do período de administração das doses. O animal foi preso numa funda de limitação de movimentos. Colocou-se uma cápsula numa pistola de pílulas, que é um dispositivo de plástico com um êmbolo rápido e uma ponta de borracha aberta para acomodar uma cápsula. A pistola de pílulas foi inserida no esófago do animal. O êmbolo da pistola de pílulas foi pressionado para empurrar a cápsula para fora da ponta de borracha para o interior do esófago. A pistola de pílulas foi então encolhida. A boca do animal foi mantida fechada e administraram-se aproximadamente 5 mL de água para osmose inversa para o interior da boca de lado para induzir um reflexo de deglutição. A garganta do animal foi ainda friccionada para induzir o reflexo de deglutição. Recolheram-se amostras de sangue com citrato (1 mL cada) por venipunctura de uma veia apropriada 1 hora antes da administração da dose e aos 10, 20, 30, 40 e 50 minutos e 1, 1,5, 2, 3, 4 e 6 horas após administração da dose. Cada amostra de plasma recolhida foi dividida em duas porções. uma porção foi congelada a -80°C e enviada para outra localização para análise de insulina. A outra porção foi utilizada na análise de glucose no sangue. Quatro símios também receberam insulina por via subcutânea (0,02 mg/kg). Recolheram-se amostras de sangue e analisaram-se conforme descrito atrás.

Análises de insulina Os níveis de insulina no soro foram medidos utilizando o conjunto de análise de insulina ELISA (DSL, Webster, TX.).

Análise de glucose. As medições de glucose no sangue foram realizadas utilizando o ONETOUGH® Glucose Monitoring System de Live Scan Inc., Newtown, PA.

Os resultados são apresentados no Quadro 1A seguinte.

Quadro 1A Insulina - Administração oral a símios

Composto	Dose do composto (mg/kg)	Dose de insulina (mg/kg)	Pico médio no soro Insulina humana ($\mu\text{U/mL} \pm \text{DP}$)	Pico médio no sangue Redução de glucose ($\mu\text{U/mL} \pm \text{DP}$)
1d	100	0,5	91,4 $\pm$ 45	-52,3 $\pm$ 5,3
1d	50	0,5	124,1 $\pm$ 51,95	-61 $\pm$ 12,7
1d	25	0,5	87,14 $\pm$ 53,85	-28,75 $\pm$ 21,59
1d	25	0,25	36,35 $\pm$ 32,3	-19 $\pm$ 10,21

Exemplo 3 - Cromolina - Administração oral

Prepararam-se soluções de dosagem contendo um composto agente de administração (preparado como no Exemplo 1b) e sal dissódico de cromolina (cromolina) (Sigma, Milwaukee, Wisconsin) em água desionizada. O ácido livre do composto agente de administração foi convertido no sal sódico com um equivalente de hidróxido de sódio. A mistura foi agitada em vortex e colocada num aparelho de ultra-sons (cerca de 37 °C). O pH foi ajustado a cerca de 7 a 7,5 com NaOH aquosa. Adicionou-se mais NaOH, se necessário, para conseguir uma solubilidade uniforme e o pH foi reajustado. A mistura foi agitada em vortex para obter uma solução uniforme, utilizando também ultra-sons e calor se necessário. A solução do composto agente de administração foi misturada com cromolina de uma solução mãe (175 mg de cromolina/mL em água desionizada, pH ajustado, se necessário, com NaOH ou HCl até cerca de 7,0, solução mãe guardada congelada embalada em película metálica, depois descongelada e aquecida até cerca de 30 °C antes de

utilizada). A mistura foi agitada em vortex para obter uma solução uniforme, utilizando também ultra-sons e calor se necessário. O pH foi ajustado a cerca de 7 a 7,5 com NaOH aquosa. A solução foi em seguida diluída com água até ao volume pretendido (normalmente 2,0 mL) e à concentração desejada e foi conservada enrolada em película metálica antes de utilização. As doses do composto agente de administração e de cromolina e as doses em volume finais são dadas seguidamente no Quadro 2.

Os protocolos de dosagem e de amostragem típicos foram os seguintes. Mantiveram-se em jejum durante 24 horas ratos Sprague-Dawley machos de peso entre 200 e 250 g e foram anestesiados com cetamina (44 mg/kg) e cloropromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da dose e depois conforme necessário para manter a anestesia. Administrou-se a um grupo de cinco animais uma das soluções de doseamento. Adaptou-se um cateter francês Rusch 8 de 11 cm a uma seringa de 1 mL com uma ponta de pipeta. Encheu-se a seringa com a solução de dosagem aspirando a solução através do cateter, o qual foi em seguida limpo até estar seco. O cateter foi enfiado no esófago, deixando 1 cm de tubo depois da incisão. Administrou-se a solução pressionando o êmbolo da seringa.

Recolheram-se amostras de sangue através da artéria caudal, tipicamente nos momentos a 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 horas após a administração. Mediram-se as concentrações de cromolina no soro por HPLC. As amostras foram preparadas do modo seguinte: Combinaram-se 100 µL de soro com 100 µL de HCl 3 N e 300 µL de acetato de etilo num tubo de Eppendorf. Agitou-se o tubo num vortex durante 10 minutos e em seguida centrifugou-se durante 10 minutos a 10.000 rpm.

Transferiram-se 200 µL da camada de acetato de etilo para um tubo de Eppendorf que continha 67 µL de tampão de fosfato 0,1 M. Agitou-se o tubo num vortex durante 10 minutos e em seguida centrifugou-se durante 10 minutos a 10.000 rpm. A camada de tampão de fosfato foi em seguida transferida para um frasco de HPLC e injectada no HPLC (coluna = Keystone Exsil Amino 150x2 mm d.i., 5 µm, 100 Å (Keystone Scientific Products, Inc.); fase móvel = 35% de tampão (KH₂PO₄ 68 mM ajustado a pH 3,0 com H₃PO₄ a 85%)/65% de acetonitrilo; volume injectado = 10 µL; caudal = 0,30 mL/minuto; tempo de retenção da cromolina = 5,5 minutos; absorvância detectada a 240 nm). Estudos anteriores indicaram valores da linha de base de cerca de zero.

Calculou-se a média dos resultados dos animais em cada grupo para cada instante e a mais elevada destas médias (isto é, o pico médio da concentração de cromalina no soro) é apresentada em seguida no Quadro 2.

Quadro 2 - Cromolina - Administração oral

Composto	dose em volume (mL/kg)	Dose do composto (mg/kg)	Dose de cromolina (mg/kg)	Pico médio no soro [cromolina ± DP (EP)]
1b	1	200	25	0,70 ± 0,36 (0,16)

Exemplo 4: Hormona de crescimento humana recombinante (rhGH) - Administração oral

Prepararam-se em tampão de fosfato soluções de dosagem de administração oral (PO) de composto agente de administração (preparado como no Exemplo 1a ou 1b conforme indicado no Quadro 3 seguinte) e rhGH em tampão de fosfato. O ácido livre do composto agente de administração foi convertido no sal sódico com um equivalente de hidróxido de sódio.

Tipicamente, uma solução do composto foi preparada em tampão de fosfato e agitada, adicionando um equivalente de hidróxido de sódio (1,0 N) quando se preparou o sal sódico. Adicionou-se mais NaOH, se necessário, para conseguir uma solubilidade uniforme e o pH foi reajustado. As soluções finais de dosagem foram preparadas misturando a solução do composto com uma solução mãe de rhGH (15 mg de rhGH/mL preparada por mistura sob a forma de pós 15 mg de rhGH, 75 mg de D-manitol, 15 mg de glicina e 3,39 mg de fosfato de sódio dibásico, seguida de diluição com glicerol a 2%) e diluindo até ao volume pretendido (normalmente 3,0 mL). As doses de composto e rhGH e os volumes das doses são apresentados em seguida no Quadro 3.

Os protocolos de dosagem e de amostragem típicos foram os seguintes. Mantiveram-se em jejum durante 24 horas ratos Sprague-Dawley machos de peso entre 200 e 250 g e administrou-se cetamina (44 mg/kg) e cloropromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da dose e depois conforme necessário para manter a anestesia. Administrou-se a um grupo de cinco animais uma das soluções de doseamento. Adaptou-se um cateter francês Rusch 8 de 11 cm a uma seringa de 1 mL com uma ponta de pipeta. Encheu-se a seringa com a solução de doseamento aspirando a solução através do cateter, o qual foi em seguida limpo até estar seco. O cateter foi enfiado no esófago, deixando 1 cm de tubo depois da incisão. Administrou-se a solução pressionando o êmbolo da seringa.

Recolheram-se amostras de sangue em série da artéria caudal, tipicamente nos momentos = 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração. As concentrações de rhGH no soro foram quantificadas por um conjunto de análise imunológica

(Kit n.º K1F4015 de Genzyme Corporation Inc., Cambridge, MA). Estudos anteriores indicaram valores da linha de base de cerca de zero.

Foi calculada a média dos resultados dos animais em cada grupo para cada instante. O máximo destas médias (isto é, o pico médio da concentração de rhGH no soro) é apresentado em seguida no Quadro 3. (Nos casos em que não é indicado o desvio padrão (DP) nem o erro padrão (EP), as cinco amostras de cada período de tempo foram reunidas antes da análise.)

Quadro 3 - rhGH - Administração oral

Composto	dose em volume (mL/kg)	Dose do composto (mg/kg)	Dose de rhGH (mg/kg)	Pico médio no soro [rhGH] $\pm$ DP (EP) (ng/mL)
1a	1	200	3	99,35
1a	1	200	3	42,62
1b	1	200	3	84,01 $\pm$ 73,57 (32,90)
1b	1	200	3	50,44 $\pm$ 34,13 (15,26)

Exemplo 5 - Interferão - Administração oral

Prepararam-se soluções de dosagem do composto agente de administração (preparado como no Exemplo 1b) e interferão humano (IFN) em água desionizada. O ácido livre do composto agente de administração foi convertido no sal sódico com um equivalente de hidróxido de sódio. Tipicamente, uma solução do composto agente de administração foi preparada em água e agitada, adicionando um equivalente de hidróxido de sódio (1,0 N) quando se preparou o sal sódico. A mistura foi agitada em vortex e colocada num aparelho de ultra-sons (cerca de 37 °C). O pH foi ajustado a cerca de 7,0 a 8,5

com NaOH aquosa. A mistura foi agitada em vortex para obter uma suspensão ou solução uniforme, utilizando também ultrasons e calor se necessário. Adicionou-se mais NaOH, se necessário, para conseguir uma solubilidade uniforme e o pH foi reajustado. A solução do composto agente de administração foi misturada com uma solução mãe de IFN (cerca de 22,0 a 27,5 mg/mL em salina tamponizada com fosfato) e diluída até ao volume pretendido (normalmente 3,0 mL). As doses do composto agente de administração e de IFN e as doses em volume finais são dadas seguidamente no Quadro 4.

Os protocolos de dosagem e de amostragem típicos foram os seguintes. Mantiveram-se em jejum durante 24 horas ratos Sprague-Dawley machos de peso entre 200 e 250 g e administrou-se cetamina (44 mg/kg) e cloropromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da dose e depois conforme necessário para manter a anestesia. Administrou-se a um grupo de cinco animais uma das soluções de dosagem. Adaptou-se um cateter francês Rusch 8 de 11 cm a uma seringa de 1 mL com uma ponta de pipeta. Encheu-se a seringa com a solução de dosagem aspirando a solução através do cateter, o qual foi em seguida limpo até estar seco. O cateter foi enfiado no esófago, deixando 1 cm de tubo depois da incisão. Administrou-se a solução pressionando o êmbolo da seringa.

Recolheram-se amostras de sangue em série da artéria caudal, tipicamente nos momentos = 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração. As concentrações de IFN no soro foram quantificadas utilizando Cytoscreen Immunoassay Kit para IFN-alfa humano (n.º de catálogo KHC4012 de Biosource International, Camarillo, CA). Estudos anteriores

indicaram valores da linha de base de cerca de zero. Foi calculada a média dos resultados dos animais em cada grupo para cada instante. O máximo destas médias (isto é, o pico médio da concentração de IFN no soro) é apresentado em seguida no Quadro 4.

Quadro 4 - Interferão - Administração oral

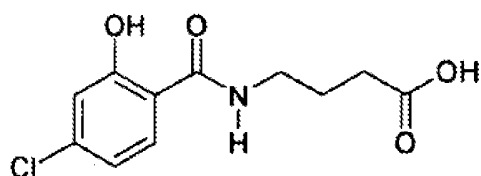
Composto	Dose em volume (mL/kg)	Dose do composto (mg/kg)	Dose de IFN (mg/kg)	Pico médio no soro [IFN] (ng/mL) $\pm$ DP (EP)
1b	1,0	200	1,0	17,80 $\pm$ 13,52 (6,05)

As patentes, pedidos de patente, métodos de ensaio e publicações atrás mencionados são dados como aqui integralmente incorporados por referência.

Lisboa, 29 de Abril de 2008

REIVINDICAÇÕES

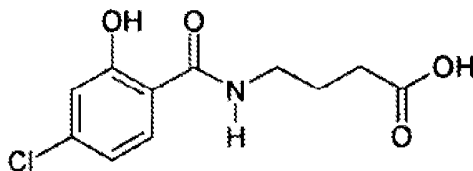
1. Composto da fórmula



ou um sal do mesmo.

2. Composição que compreende:

- (A) um agente biologicamente activo; e
- (B) um composto que tem a fórmula



um seu sal ou uma mistura dos mesmos.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que o agente biologicamente activo compreende pelo menos uma proteína, um polipeptídeo, um peptídeo, uma hormona, um polissacárido, um mucopolissacárido, um hidrato de carbono ou um lípido.

4. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que o agente biologicamente activo é seleccionado do grupo constituído por:

hormonas do crescimento, hormonas de crescimento humanas, hormonas de crescimento humanas recombinantes, hormonas de

crescimento bovinas, hormonas de crescimento suínas, hormonas de libertação de hormona do crescimento, interferões, α -interferão, β -interferão e γ -interferão, interleucina-1, interleucina-2, insulina, insulina suína, insulina bovina, insulina humana, insulina humana recombinante, factor de crescimento semelhante a insulina, factor de crescimento semelhante a insulina -1; heparina, heparina não fraccionada, heparinóides, dermatanos, condroitinas, heparina de baixo peso molecular, heparina de peso molecular muito baixo, heparina de peso molecular ultra baixo, calcitonina, calcitonina de salmão, calcitonina de enguia, calcitonina humana; eritropoietina (EPO), factor naturético atrial, antigénios, anticorpos monoclonais, somatostatina, inibidores de protease, adrenocorticotropina, hormona da libertação de gonadotropinas, oxitocina, hormona de libertação da hormona de luteinização, hormona estimuladora do folículo, glucocerebrosidase, trombopoietina, filgrastim, prostaglandinas, ciclosporina, vasopressina, cromolina sódica, cromoglicato sódico, cromoglicato dissódico, vancomicina, desferrioxamina, hormona paratiróide, fragmentos da hormona paratiróide, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos e derivados modificados por polietilenoglicol destes compostos; e qualquer combinação dos mesmos.

5. Composição de acordo com reivindicação 2, em que o agente biologicamente activo compreende insulina, hormona do crescimento humana, interferão, cromolina sódica ou combinações das mesmas.
6. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que o agente biologicamente activo compreende insulina.

7. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que o agente biologicamente activo compreende insulina.

8. Forma unitária de dosagem que compreende:

(A) a composição de acordo com a reivindicação 2; e

(B)

(a) um excipiente

(b) um diluente,

(c) um desintegrante,

(d) um lubrificante,

(e) um plastificante,

(f) um corante,

(g) um veículo de dosagem, ou

(h) qualquer combinação dos mesmos.

9. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o agente biologicamente activo compreende pelo menos uma proteína, um polipeptídeo, um peptídeo, uma hormona, um polissacárido, um mucopolissacárido, um hidrato de carbono ou um lípido.

10. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o agente biologicamente activo é seleccionado do grupo constituído por:

hormonas do crescimento, hormonas de crescimento humanas, hormonas de crescimento humanas recombinantes, hormonas de crescimento bovinas, hormonas de crescimento suínas, hormonas de libertação de hormona do crescimento, interferões, α -interferão, β -interferão e γ -interferão,

interleucina-1, interleucina-2, insulina, insulina suína, insulina bovina, insulina humana, insulina humana recombinante, factor de crescimento semelhante a insulina, factor de crescimento semelhante a insulina -1, heparina, heparina não fraccionada, heparinóides, dermatanos, condroitinas, heparina de baixo peso molecular, heparina de peso molecular muito baixo, heparina de peso molecular ultra baixo, calcitonina, calcitonina de salmão, calcitonina de enguia, calcitonina humana, eritropoietina, factor naturético atrial, antigénios, anticorpos monoclonais, somatostatina, inibidores de protease, adrenocorticotropina, hormona da libertação de gonadotropinas, oxitocina, hormona de libertação da hormona de luteinização, hormona estimuladora do folículo, glucocerebrosidase, trombopoietina, filgrastim, prostaglandinas, ciclosporina, vasopressina, cromolina sódica, cromoglicato sódico, cromoglicato dissódico, vancomicina, desferrioxamina, hormona paratiróide, fragmentos da hormona paratiróide, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos e derivados modificados por polietilenoglicol destes compostos; e qualquer combinação dos mesmos.

11. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o agente biologicamente activo compreende insulina, hormona do crescimento humana, interferão, cromolina sódica ou combinações das mesmas.

12. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o agente biologicamente activo compreende insulina.

13. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o agente biologicamente activo compreende interferão.

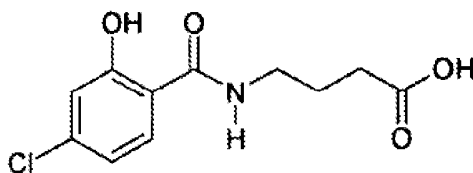
14. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que a forma unitária de dosagem está sob a forma de um comprimido, uma cápsula, uma partícula, um pó, uma saqueta ou um líquido.

15. Forma unitária de dosagem de acordo com a reivindicação 8, em que o veículo de dosagem é um líquido seleccionado do grupo constituído por água, propilenoglicol aquoso a 25%, tampão de fosfato, 1,2-propanodiol, etanol e qualquer combinação dos mesmos.

16. Método para a preparação de uma composição que compreende misturar:

- (A) pelo menos um agente biologicamente activo;
- (B) o composto de acordo com a reivindicação 1; e
- (C) opcionalmente um veículo de dosagem.

17. Um composto anidro que tem a fórmula



ou um sal do mesmo.

18. 4-[(4-Cloro-2-hidroxibenzoíl)amino]butanoato de sódio anidro.

19. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que o sal é um sal monossódico.

20. Hidrato canal de 4-[(4-cloro-2-hidroxibenzoíl)amino]-butanoato de sódio que tem um teor de água desde cerca de 3% até cerca de 6% em peso.

21. Solvato de isopropanol de 4-[(4-cloro-2-hidroxi-benzoíl)amino]butanoato de sódio.

22. Composição que compreende:

- (a) um agente biologicamente activo; e
- (b) o composto anidro de acordo com a reivindicação 18.

23. Composição que compreende:

- (a) um agente biologicamente activo; e
- (b) o hidrato canal de acordo com a reivindicação 20.

24. Composição que compreende:

- (a) um agente biologicamente activo; e
- (b) o solvato de isopropanol de acordo com a reivindicação 21.

25. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é insulina.

26. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é hormona do crescimento humana.

27. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é hormona do crescimento humana recombinante.

28. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é cromolina sódica.

29. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é heparina.

30. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é calcitonina.

31. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 24, em que o agente biologicamente activo é hormona paratiróide.

32. Forma de dosagem sólida que compreende:

(A) a composição de acordo com qualquer das reivindicações 22 a 31; e

(B)

- (a) um excipiente,
- (b) um diluente,
- (c) um desintegrante,
- (d) um lubrificante,
- (e) um plastificante,
- (f) um corante,
- (g) um veículo de dosagem, ou
- (h) qualquer combinação dos mesmos.

33. Forma de dosagem sólida de acordo com a reivindicação 32, em que a forma de dosagem sólida é um comprimido ou uma cápsula.

Lisboa, 29 de Abril de 2008