

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
Nº 93 974

NOME: NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona e de composições farmacêuticas"

INVENTORES: Robert Charles Hider, Michael Arthur Stockham

Reivindicação do direito de prioridade (ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883):

Reino Unido em 8 de Maio de 1989 sob o nº. 8910521.7

70 989
132479

PATENTE No. 93 974

"Processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona e de composições farmacêuticas"

para que

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona, caracterizado por compreender a mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona, que é:

(1) uma 3-hidroxipirid-2-ona ou uma 3-hidroxipirid-4-ona, na qual o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto está substituído por um grupo acilo alifático, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um ou mais substituintes seleccionados a partir dos grupos acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo e hidroxí e, na qual, opcionalmente, um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um grupo acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, por um grupo hidrocarboneto alifático ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, ou um seu sal;

(2) uma 1-hidroxipirid-2-ona, na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão

70 989

132479

-2-

substituídos por um substituinte seleccionado a partir dos grupos acilo alifático, amida alifática, ciano, éster alifático, halogéneo e hidroxi, grupos alcoxi e cicloalcoxi e grupos alcoxi e cicloalcoxi substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éter alifático, halogéneo ou hidroxi, e grupos hidrocarboneto alifático e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxi, mas excluindo os compostos nos quais a dita substituição dos átomos de hidrogénio só é efectuada por substituintes seleccionados a partir dos grupos hidrocarboneto alifático, grupos halogéneo e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo halogéneo, ou um seu sal; ou

(3) um composto no qual dois ou mais anéis, seleccionados a partir de 3-hidroxipirid-2-onas, 3-hidroxipirid-4-onas e 1-hidroxipirid-2-onas, estão covalentemente ligados aos anéis que mantêm os seus grupos hidroxi e oxo adjacentes; a qual é importante na estabilização do péptido ou da proteína.

MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se ao processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona, a qual é importante na estabilização de compostos orgânicos, em particular péptidos e proteínas.

Os péptidos e as proteínas podem mostrar instabilidade,

ocorrendo clivagem nas ligações $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}-$, para formar moléculas mais pequenas. Têm sido apresentadas diferentes teorias relativamente às quais, os resíduos de aminoácidos são particularmente capazes de conduzir à instabilidade, sendo um destes resíduos identificantes dos aminoácidos histidina e prolina. Podem surgir problemas consideráveis na produção e armazenamento destes compostos, como consequência da sua falta de estabilidade, o que pode ser ilustrado por referência a um dos tipos mais comuns, dos vários péptidos e proteínas usadas em terapia, a insulina, que é utilizada para o tratamento da diabetes mellitus. Assim, a insulina pode formar agregados e, embora isto, por si só, não ser desvantajoso, se estes sofrerem modificação química de modo a não se desagregarem in vivo, tal terá o efeito de baixar a actividade fisiológica da insulina. Além disso, a modificação química da insulina pode resultar num produto que é reconhecido como estranho pelo sistema imunológico com a possibilidade do desenvolvimento de uma reacção alérgica pelo paciente.

Foi investigada uma variedade de agentes quelantes para verificar se eram adequados para efectuar a estabilização dos materiais peptídicos proteicos usados para fins terapêuticos ou para outros fins. Surpreendentemente, verificou-se, por exemplo, que enquanto que certos agentes quelantes tais como o ácido etilenodiaminotetra-acético e a 3-hidroxi-2-metil-4-pirona não têm qualquer efeito estabilizador na insulina, e podem de facto exibir um efeito desestabilizador, certos outros agentes quelantes efectuem a estabilização, particularmente a cerca de 40°C. Tal estabilização a baixa temperatura é de importância considerável, uma vez que, a insulina é armazenada sob forma de

70 989

132479

-4-

solução ou no estado criodessecado a cerca de 40°C antes da utilização ou, a cerca de -100°C, durante as várias fases de produção e expedição do produto a granel.

Assim, o presente invento compreende o processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína, e de uma hidroxipiridona, que é:

(1) uma 3-hidroxipirid-2-ona ou uma 3-hidroxipirid-4-ona, nos quais o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto está substituído por um grupo acilo alifático, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um ou mais substituintes seleccionados de entre os grupos acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo e hidroxí e, nas quais, opcionalmente, um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um grupo acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, por um grupo hidrocarboneto alifático ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, ou um seu sal;

(2) uma 1-hidroxipirid-2-ona, na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um substituinte seleccionado de entre os grupos aciloalifático, amida alifática, ciano, éster alifático, halogéneo e hidroxí, grupos alcoxi e cicloalcoxi e grupos alcoxi e cicloalcoxi substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, e grupos hidrocarboneto alifático e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, excluindo os compostos nos quais a dita substituição dos átomos de hidrogénio só é efectuada por substituintes seleccionados de entre os grupos hidrocarboneto alifático, grupos halogéneo e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo halogéneo ou um seu sal; ou

(3) um composto no qual dois ou mais anéis, seleccionados a

70 989

132479

-5-

partir de 3-hidroxi-pirid-2-onas, 3-hidroxi-pirid-4-onas e 1-hidroxi-pirid-2-onas, estão ligados covalentemente aos anéis que retêm os seus grupos hidroxí e oxo adjacentes; mas excluindo qualquer ocorrência da mistura in vivo.

O invento pode ser aplicado à estabilização da ligação carbono-azoto dos agrupamentos $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array}$ em vários péptidos e proteínas, particularmente naqueles que têm uma actividade biológica, de qualquer tipo incluindo hormonas animais e de plantas, por exemplo, hormona paratiróide, calcitonina, corticotrofina, citoquinas, hormonas do crescimento e, particularmente, insulina, hormonas que controlam a libertação de outros compostos, compostos que são frequentemente, eles próprios, hormonas, por exemplo, hormona libertadora da gonadotrofina, LHRH e antagonistas da LHRH, imunoglobulinas, por exemplo, anticorpos monoclonais, factores de coagulação do sangue, por exemplo, Factor VIII, enzimas e inibidores de enzimas, por exemplo trombina, assim como fragmentos de cada um destes. O termo insulina é aqui utilizado para incluir não só a hormona de várias espécies, que ocorre naturalmente, por exemplo, insulina humana, bovina e porcina, mas também versões sintéticas da hormona natural e seus análogos sintéticos possuindo a actividade hormonal.

Em adição à estabilização de insulinas, outras áreas de estabilização de péptidos e proteínas, nas quais o presente invento é particularmente aplicável incluem as vacinas, i.e. produtos compreendendo materiais antigénicos ou anticorpos, produtos anti-alérgicos em geral e, particularmente, as várias formas de produtos do sangue. Tais produtos do sangue incluem plasma humano, fibrinogénio, imunoglobulinas, factores de coagulação do sangue, tais como o Factor VIII, e trombina e sofrem de problemas similares de armazenamento àqueles experimentados com as insulinas.

Convenientemente, o invento pode ser utilizado, com hexapéptidos e péptidos maiores ou proteínas, mais especialmente

70 989

132479

-6-

com decapeptidos e, particularmente, icosa-peptidos, e peptidos maiores ou proteinas. Em termos de massas moleculares, a preferencia e para a utilizacao de um peptido ou de uma proteina com uma massa molecular de 500 ou 600 daltons ou mais, por exemplo 1200 ou 2400 daltons ou mais. Assim, a instabilidade de peptidos e proteinas e mais pronunciada onde a cadeia e suficientemente longa para sofrer enrolamento com consequentes interacoes entre as suas diferentes partes, embora certos aminoacidos tais como a metionina possam induzir instabilidade mesmo sem ocorrer um tal enrolamento do peptido ou da proteina.

Os materiais estabilizados podem, evidentemente, conter outros agrupamentos alem dos residuos de aminoacidos ligados, por exemplo grupos glicosilo ou podem conter outros compostos misturados com os peptidos e as proteinas.

Os compostos de hidroxipiridona dos tipos (1), (2) e (3) sao descritos em detalhe nas patentes do Reino Unido GB 2118176B e 2136807B; GB 2146990B; e GB 2146989B, respectivamente, que se referem a utilizacao de tais compostos para a remocao de quantidades toxicas de metal do corpo; e, os varios tipos especificos de compostos preferidos, descritos nestas patentes, podem ser usados no presente invento. Certos compostos dos tipos (2) e (3) sao, tambem, descritos na patente dos Estados Unidos 4698431.

Entre os compostos destas patentes anteriores que podem ser particularmente mencionados, estao aqueles, nos quais, os aneis nao estao substituidos a nao ser por grupos de ligacao no caso daqueles compostos contendo dois ou mais aneis, e, para estes dois compostos e para os compostos de anel unico, aqueles, nos quais, os aneis estao substituidos por grupos hidrocarboneto alifatico (no caso das 3-hidroxipiridonas e, particularmente, no atomo de azoto do anel), por grupos hidrocarboneto alifatico substituidos por um grupo hidroxil ou cicloalcoxi ou, particularmente, um grupo alcoxi ou por mais do que um, por exemplo dois de tais grupos (no caso das 1- e 3-hidroxipiridonas e, particularmente, no atomo de azoto do anel, no ultimo caso),

70 989

132479

-7-

ou por um grupo amida alifática ou por um grupo alcoxi ou cicloalcoxi substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática ou hidroxí (no caso das 1-hidroxipiridonas). O tamanho das porções hidrocarboneto alifático e alquilo ou cicloalquilo em tais grupos (incluindo aquelas nos grupos amida alifática) está, convenientemente, numa gama de C₁₋₈, particularmente, C₁₋₆, por exemplo C₁₋₄, tal como metilo e etilo.

As hidroxipiridonas úteis no presente invento são discutidas em detalhe nas patentes anteriores mas os compostos de interesse particular no contexto do presente invento são compostos neutros solúveis em água com um carácter hidrofílico. Como mostrado nestas patentes anteriores, é possível equilibrar a presença de um substituinte hidrofílico pela presença de um ou mais substituintes hidrofóbicos mas, de forma a alcançar-se o carácter hidrofílico apropriado no composto, é preferível, por exemplo, que o número de átomos de carbono nas porções hidrocarboneto alifático, alcoxi e cicloalcoxi e em tais porções substituídas seja limitado. Assim, os grupos hidrocarboneto alifático são, convenientemente, de 1 a 4 átomos de carbono, especialmente 1 ou 2 átomos de carbono, quando estes grupos não estão eles próprios substituídos. São preferidos os grupos acíclicos aos grupos cíclicos, assim como são preferidos os grupos saturados aos insaturados; sendo os grupos hidrocarboneto alifático não substituídos, preferidos, e aqueles nos grupos amida alifática, os grupos alquilo: etilo, e particularmente metilo. Os grupos hidrocarboneto alifático substituídos são, convenientemente, de 1 a 6 átomos de carbono, de preferência de 1 a 4 átomos de carbono, especialmente de 1, 2 ou 3 átomos de carbono. São, de novo, preferidos os grupos acíclicos aos cíclicos, e os grupos saturados aos insaturados, sendo os grupos hidrocarboneto alifático substituídos, preferidos, grupos metilo, etilo, isopropilo e n-propilo substituídos, sendo convenientemente os três últimos grupos alquilo, terminalmente substituídos. Os grupos alcoxi são preferidos aos grupos cicloalcoxi e os primeiros são, convenientemente, de 1 a 6 átomos de carbono, de preferência de 1 a 4 átomos de carbono e especialmente de 1 ou 2

70 989

132479

-8-

átomos de carbono. Os grupos amida alifática contêm, convenientemente, não mais do que um grupo hidrocarboneto alifático que pode, por exemplo, ser etilo ou, especialmente, metilo.

Exemplos específicos de substituintes do grupo hidrocarboneto alifático substituído são o hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, metoximetilo, 2-metoxietilo, 3-metoxipropilo, 2-metoxi-1-metiletilo, etoximetilo, 2-etoxietilo, 3-etoxipropilo e 2-etoxi-1-metiletilo, sendo de menor interesse, no caso dos N-substituintes, os grupos nos quais o átomo de oxigênio está ligado ao átomo de carbono ligante do grupo, devido

à menor estabilidade do agrupamento $\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{N}-\text{C}-\text{O}- \\ | \end{array}$ quando comparada à do $\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{C}-\text{C}-\text{O}- \\ | \quad | \end{array}$.

No que respeita quer aos compostos de anel único quer àqueles contendo dois ou mais anéis, de entre as 3-hidroxipiridinas, são as 3-hidroxipirid-4-onas que são de especial interesse, e há, também, particular interesse nas 1-hidroxipirid-2-onas. Assim, um primeiro grupo preferido de compostos consiste em 3-hidroxipirid-4-onas de anel único, nas quais, cada um dos átomos de carbono do anel, independentemente dos outros, está, quer não substituído quer substituído por um grupo hidrocarboneto alifático, por exemplo como descrito acima, convenientemente, na posição 6 ou particularmente na posição 2, estando o átomo de azoto substituído quer por um grupo hidrocarboneto alifático quer por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por hidroxil ou, particularmente, por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por alcoxi, por exemplo como acima descrito. Exemplos específicos de tais compostos são a 3-hidroxi-1,2-dimetilpirid-4-ona, 1-etil-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-hidroxietil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-hidroxi-1'-metiletil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-hidroxipropil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(3'-hidroxipropil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-metoxi-1'-metiletil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(2'-metoxi-

70 989

132479

-9-

propil)-2-metilpirid-4-ona, 3-hidroxi-1-(3'-metoxipropil)-2-metilpirid-4-ona, 1-(2'-etoxietil)-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, 1-(2'-etoxi-1'-metiletil)-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, 1-(2'-etoxipropil)-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, 1-(3'-etoxipropil)-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, e seus sais. Outros exemplos específicos, incluem os análogos dos compostos acabados de mencionar, nos quais, o grupo metilo na posição 2 está substituído por um grupo etilo, por exemplo, 1,2-dietil-3-hidroxi-2-metilpirid-4-ona, e seus sais. De especial interesse são os compostos contendo um grupo metoxi, particularmente a 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona e seus sais.

Um segundo grupo de compostos, preferido, consiste em 1-hidroxi-2-piridonas de anel único nas quais os átomos de carbono do anel estão substituídos convenientemente na posição 6- ou 4- por um substituinte alcoxi, alcoxialcoxi ou amida alifática. Exemplos específicos de tais compostos são a 1-hidroxi-4-(2'-metoxietoxi)pirid-2-ona, 1-hidroxi-4-(2'-etoxietoxi)pirid-2-ona e 6-carbamoil-1-hidroxi-2-piridona e os seus análogos 6-(N-metilcarbamoil) e 6-(N-etilcarbamoil) e seus sais.

Um terceiro grupo de compostos, preferido, consiste em compostos contendo três anéis 3-hidroxi-2-piridona ou -4-ona, nos quais, os átomos de carbono e azoto dos anéis estão quer não substituídos, a não ser por grupos ligantes, quer substituídos por um grupo hidrocarboneto alifático, por exemplo como descrito acima, particularmente na posição 6- ou, especialmente, na posição 2- no caso das 4-onas.

Um quarto grupo, preferido, consiste em compostos contendo três anéis 1-hidroxi-2-piridona, nos quais, os átomos de carbono dos anéis estão quer não substituídos, a não ser por grupos ligantes, quer substituídos por um grupo hidrocarboneto alifático ou por um grupo amida alifática, por exemplo como acima descrito, particularmente na posição 6- ou 4-. A ligação dos anéis através dos seus átomos de carbono ou particularmente através dos seus átomos de azoto para as 3-hidroxi-2-piridonas é efectuada convenientemente por grupos ligantes que são de uma natureza de hidrocar-

70 989

132479

-10-

boneto alifático ou que contêm, adicionalmente, um ou mais grupos -NH-, -N-, -CONH- e -CON . Exemplos específicos de tais compostos são o composto N,N-di-[2-(3-hidroxi-2-oxopirid-1-ilacetamido)etil]-2-(3-hidroxi-2-oxopirid-1-ilacetamido)etilamina do Exemplo 8 da GB 2146989B e os compostos 6B, 6C, 9 e 10 registados na Tabela 4 daquela patente.

Certos tipos de compostos de hidroxipiridona podem ser mais adequados do que outros para utilização em meios particulares. Assim, os péptidos e as proteínas podem ser armazenados a vários pHs, sendo, as diferentes formas de preparações de insulina, armazenadas, em particular, quer a pHs acídicos quer a pHs alcalinos. Para pHs na gama de cerca de 3-5 os compostos de 1-hidroxipirid-2-ona, quer na forma de anel único, quer na forma de multi-anel, por exemplo, na forma de três anéis, são de interesse particular, enquanto que, para pHs mais elevados, os compostos de 3-hidroxipirid-4-ona, quer na forma de anel único quer na forma de multi-anel, por exemplo na forma de três anéis, são de interesse particular.

As hidroxipiridonas podem ser preparadas pelos procedimentos descritos nas quatro patentes anteriores, acima referidas. Em particular, as C-carbamoil- e as C-carbamoil alquilado-1-hidroxipiridonas podem ser preparadas como descrito na Patente dos Estados Unidos 4 698 431 e os compostos de N-alcoxialquilo e N-hidroxialquilo-3-hidroxipirid-4-ona podem ser preparados como descritos na patente do Reino Unido GB 2136807B. Esta última via envolve a reacção de uma 3-hidroxi-4-pirona correspondente, ou de uma 3-hidroxi-4-pirona contendo grupos convertíveis nos C-substituintes presentes na hidroxipiridona desejada, com um composto R'NH₂, no qual, R' representa o grupo presente no átomo de azoto do composto desejado ou num grupo convertível nele, sendo a reacção realizada na presença de uma base, por exemplo de um hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de sódio. Este procedimento está exemplificado especificamente na GB 2136807B para a 3-hidroxi-1-(2'-hidroxietil)-2-metilpirid-4-ona e para compostos contendo grupos N-hidroxialquilo maiores, e pode ser

aplicado de um modo exactamente análogo à preparação dos compostos de N-alcoxialquilo correspondentes. Assim, o uso da 2-metoxietilamina em lugar da 2-hidroxi-etilamina no Exemplo 11 da GB 2136807B derá o composto 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona que é de algum interesse particular.

Onde apropriado, as hidroxipiridonas podem ser utilizadas na forma de sal, particularmente como um sal fisiologicamente aceitável. Assim os sais podem ser formados entre o anião produzido pela perda do protão do grupo hidroxil e um catião tal como um ião de metal alcalino, por exemplo Na^+ , iões de amónio quaternário ou aminas protonadas tais como tris (o tris representa o 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol). Como uma alternativa à formação de sal com uma base, o átomo de azoto de um anel 3-hidroxipiridona pode ser suficientemente básico, particularmente no caso das 3-hidroxipirid-4-onas, para a formação de sal ser efectuada através de reacção com um ácido tal como ácido clorídrico. Será apreciado que, quando o péptido ou a proteína estão em solução, a questão de ser apropriado usar um sal, dependerá do pH da solução, sendo os sais formados com um catião apropriados para uso acima de cerca de pH5, no caso das 1-hidroxipiridonas, e acima de cerca de pH9, no caso das 3-hidroxipirid-4-onas, enquanto que os sais de 3-hidroxipirid-4-ona formados com um anião são apropriados para uso acima de cerca de pH7.

O presente invento é, particularmente, aplicável à estabilização de péptidos e proteínas à temperatura ambiente ou a temperaturas inferiores, por exemplo até -10°C , especialmente a 10°C ou menos e, particularmente, a 4°C , ou menos, embora também seja de interesse para uso a cerca de 37°C , especialmente quando se usam compostos incorporando mais do que um anel hidroxipiridona, por exemplo os compostos hexadentados de três anéis.

A proporção de composto de hidroxipiridona relativamente ao péptido ou à proteína pode variar dependendo da natureza dos materiais individuais envolvidos e das condições às quais o péptido ou a proteína estabilizados estão sujeitos. Contudo, como

70 989

132479

-12-

orientação, pode ser referido que a utilização de uma razão em peso entre a hidroxipiridona e o péptido ou a proteína de 0,01:1 a 100:1, em particular, de 0,1:1 a 10:1, por exemplo 2:1, é, muitas vezes, adequada.

Onde desejado, pode ser utilizado mais do que um composto de hidroxipiridona, por exemplo quer um composto bidentado de anel único quer um composto hexadentado de três anéis, aplicando, depois, as proporções dadas ao total de compostos de hidroxipiridona.

Como indicado, às vezes, a mistura pode consistir só na(s) hidroxipiridona(s) e no péptido ou na proteína, mas em muitos outros casos, a mistura pode conter outros ingredientes, por exemplo diluentes, particularmente na forma de solventes tais como água, etc., e/ou compostos que aumentam, adicionalmente, a estabilidade do péptido ou da proteína. Um componente de valor potencial na última categoria, é o zinco que pode ser proporcionado na forma de vários tipos de compostos contendo zinco embora estes sejam, muitas vezes, requeridos numa forma e numa quantidade fisiologicamente aceitáveis. Exemplos de compostos adequados são os sais de zinco tais como cloreto de zinco, particularmente quando o péptido ou a proteína estão num meio de $\text{pH} \leq 5,0$ e complexos de hidroxipiridona e zinco, particularmente quando o péptido ou a proteína estão num meio de $\text{pH} \geq 5,0$, sendo convenientemente, tais complexos, de uma hidroxipiridona como aqui descrita, por exemplo do mesmo tipo que a que está presente na forma livre de metal. Tais complexos são adicionalmente descritos na Patente do Reino Unido GB 2148896 para os compostos de 3-hidroxipiridona de anel único; e os complexos de zinco das 1-hidroxipiridonas de anel único e dos compostos de multi-anel, podem ser preparados de uma forma geralmente similar. Convenientemente, é utilizado um excesso de hidroxipiridona relativamente ao zinco, por exemplo, uma razão molar de, pelo menos, quatro moles de anel de hidroxipiridona para cada mole de zinco.

Muitas vezes, a mistura pode estar na forma de uma

composição farmacêutica contendo os materiais péptido ou proteína e hidroxipiridona conjuntamente com um diluente ou veículo fisiologicamente aceitável. A natureza de tais composições pode ser de várias formas, muitas das quais são descritas nas cinco patentes anteriores, no que respeita à formulação das hidroxipiridonas como agentes terapêuticos. No que respeita à insulina, são de particular interesse soluções e suspensões aquosas estéreis e livres de pirogênios, para injeção. Estas e outras formulações de péptidos e de proteínas, às quais o invento pode ser aplicado, são descritas na arte em relação ao péptido ou a proteína em questão.

As hidroxipiridonas são compostos relativamente não tóxicos e as composições farmacêuticas, nas quais o componente activo é um péptido ou uma proteína estabilizados por uma hidroxipiridona, numa proporção como aqui indicada, serão normalmente bastante aceitáveis para utilização directa.

Por consequência, o presente invento inclui, adicionalmente, o processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender uma mistura de um péptido ou de uma proteína fisiologicamente activos e de uma hidroxipiridona que é:

(1) uma 3-hidroxipirid-2-ona ou uma 3-hidroxipirid-4-ona, na qual o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto está substituído por um grupo acilo alifático, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um ou mais substituintes seleccionados a partir dos grupos acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo e hidroxí e, na qual, opcionalmente, um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um grupo acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, por um grupo hidrocarboneto alifático ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, ou um seu sal;

70 989

132479

-14-

(2) uma 1-hidroxipirid-2-ona, na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um substituinte seleccionado de entre os grupos acilo alifático, amida alifática, ciano, éster alifático, halogéneo e hidroxí, grupos alcoxi e cicloalcoxi e grupos alcoxi e cicloalcoxi substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éter alifático, halogéneo ou hidroxí, e grupos hidrocarboneto alifático e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, mas excluindo os compostos, nos quais, a dita substituição dos átomos de hidrogénio, só é efectuada por substituintes seleccionados de entre os grupos hidrocarboneto alifático, grupos halogéneo e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo halogéneo, ou um seu sal; ou

(3) um composto no qual dois ou mais anéis, seleccionados a partir de 3-hidroxipirid-2-onas, 3-hidroxipirid-4-onas e 1-hidroxipirid-2-onas, estão covalentemente ligados aos anéis que mantêm os seus grupos hidroxí e oxo adjacentes, conjuntamente com um diluente ou veículo fisiologicamente aceitável.

A composição irá, geralmente, conter uma quantidade terapêuticamente eficaz do péptido ou da proteína como indicada na literatura, como sendo adequada para produzir o efeito fisiológico desejado.

Na produção da mistura, os componentes hidroxipiridona e péptido ou proteína podem ser misturados na forma sólida ou em solução, dependendo da natureza física da mistura a ser estabilizada, sendo, convenientemente, aplicáveis procedimentos de mistura padrão. Contudo, muito normalmente, a composição farmacêutica final estabilizada contendo uma mistura de péptido ou proteína/hidroxipiridona, será armazenada na forma de solução ou, para uma menor extensão, na forma criodessecada. Assim, embora seja uma prática bastante comum, produzir preparações criodessecadas de péptidos e proteínas por causa da falta de estabilidade das suas soluções, o presente invento pode permitir a materiais, que são normalmente liofilizados serem produzidos na

70 989

132479

-15-

forma de solução, devido ao efeito de estabilização dos compostos de hidroxipiridona.

Em adição ao seu efeito de estabilização, as hidroxipiridonas podem exercer um outro efeito benéfico em algumas circunstâncias. Assim, há um problema potencial quer com os péptidos e as proteínas sintéticos quer com os bioelaborados, no qual, estes podem ficar contaminados com o ferro, níquel, zinco e alumínio a partir de procedimentos de purificação por HPLC. Tais metais ligar-se-ão, de preferência, às hidroxipiridonas em vez de se ligarem ao péptido ou à proteína, condição na qual eles são mais aceitáveis, quando são administrados o péptido ou a proteína contaminados. Pode ser apropriado aumentar a proporção entre o composto de hidroxipiridona e o péptido ou a proteína, se for prevista uma quantidade significativa de tal contaminação.

O invento é ilustrado pelos exemplos seguintes:

Exemplo 1: Formulação Injectável de Insulina

Uma solução aquosa estéril, livre de pirogénios de pH 7,0 contendo

bicarbonato de sódio (12 mM)
fosfato de sódio (54 mM)
fenol (0,2% p/v)
glicerol (1,6% p/v)
insulina (bovina, porcina ou humana - 10 unidades/ml;
aproximadamente 10^{-4} M)
3-hidroxi-1-(2'metoxietil)-2-metilpirid-4-ona (100 μ M)

é preparada por dissolução dos ingredientes, às concentrações indicadas em água estéril e livre de pirogénios sob condições assépticas, para proporcionar uma preparação injectável de insulina⁽¹⁾.

(1) As formas alternativas de formulação de insulina podem ser de outros tipos padrão, por exemplo, suspensão de insulina e zinco pronta, injeção de globina, zinco e insulina, suspensão de

70 989

132479

-16-

Exemplo 2: Comparação do Efeito Estabilizador da 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona e 3-hidroxi-2-metil-4-pirona

Foi preparada uma solução correspondente àquela descrita no Exemplo 1 contendo insulina de porcos e sendo livre de pirogênios mas não estéril. Para fins comparativos foi preparada uma solução adicional, na qual, a hidroxipiridona foi substituída pelo agente quelante alternativo, a 3-hidroxi-2-metil-4-pirona.

As soluções foram incubadas quer a 40°C quer a 37°C e a estabilidade da insulina foi estudada, durante um período de 12 semanas, através do uso do processo de HPLC de fase inversa descrito por Seipke *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 535-552 e por Grau, *Diabetologia*, 1985, 28, 458-463. A quantidade de insulina presente na solução às 4, 8 e 12 semanas foi então calculada como uma percentagem da quantidade original presente.

Os resultados são mostrados na Figura, a partir da qual será visto que a 3-hidroxi-2-metil-4-pirona desestabiliza a insulina quer a 37°C quer a 40°C enquanto que a 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona estabiliza a insulina, em alguma extensão até 37°C mas, particularmente, a 40°C quando não foi observada degradação durante o período total de 12 semanas.

isofano e insulina, suspensão de insulina e zinco e suspensão de protamina, zinco e insulina mas contendo, adicionalmente, uma quantidade similar de 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de uma mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona, caracterizado por compreender a mistura de um péptido ou de uma proteína e de uma hidroxipiridona, que é:

(1) uma 3-hidroxipirid-2-ona ou uma 3-hidroxipirid-4-ona, na qual o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto está substituído por um grupo acilo alifático, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um ou mais substituintes seleccionados a partir dos grupos acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo e hidroxí e, na qual, opcionalmente, um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um grupo acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, por um grupo hidrocarboneto alifático ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, ou um seu sal;

(2) uma 1-hidroxipirid-2-ona, na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um substituinte seleccionado a partir dos grupos acilo alifático, amida alifática, ciano, éster alifático, halogéneo e hidroxí, grupos alcoxi e cicloalcoxi e grupos alcoxi e cicloalcoxi substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, e grupos hidrocarboneto alifático e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxí, mas excluindo os compostos nos quais a dita substituição dos átomos de hidrogénio só é efectuada por substituintes seleccionados a partir dos grupos hidrocarboneto alifático, grupos halogéneo e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo halogéneo, ou um seu sal; ou

(3) um composto no qual dois ou mais anéis, seleccionados a partir de 3-hidroxipirid-2-onas, 3-hidroxipirid-4-onas e 1-

70 989

132479

-18-

-hidroxipirid-2-onas, estão covalentemente ligados aos anéis que mantém os seus grupos hidroxí e oxo adjacentes; mas excluindo qualquer ocorrência da mistura in vivo.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o péptido ou a proteína ser uma hormona, uma imunoglobulina, um factor de coagulação do sangue, uma enzima ou um inibidor de enzima, ou um seu fragmento.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o péptido ou a proteína ser uma insulina ou um seu fragmento.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por a hidroxipiridona ser uma 3-hidroxipirid-4-ona do tipo (1).

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por cada um dos átomos de carbono do anel da 3-hidroxipirid-4-ona, independentemente uns dos outros, estar quer não substituídos quer substituídos por um grupo hidrocarboneto alifático, estando o átomo de azoto substituído quer por um grupo hidrocarboneto alifático quer por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por hidroxí- ou alcoxi-.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a 3-hidroxipirid-4-ona ser seleccionada a partir da

3-hidroxí-1,2-dimetilpirid-4-ona,
1-etil-3-hidroxí-2-metilpirid-4-ona,
1,2-dietil-3-hidroxípirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(2'-hidroxietil)-2-metilpirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(2'-hidroxí-1'-metiletil)-2-metilpirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(3'-hidroxipropil)-2-metilpirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(2'-metoxí-1'-metiletil)-2-metilpirid-4-ona,
3-hidroxí-1-(3'-metoxipropil)-2-metilpirid-4-ona,
1-(2'-etoxietil)-3-hidroxí-2-metilpirid-4-ona,
1-(2'-etoxí-1'-metiletil)-3-hidroxí-2-metilpirid-4-ona,
1-(3'-etoxipropil)-3-hidroxí-2-metilpirid-4-ona e seus sais.

70 989

132479

-19-

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona ser 3-hidroxi-1-(2'-metoxietil)-2-metilpirid-4-ona ou um seu sal.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por a hidroxipiridona ser do tipo (2).

9 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a relação em peso entre a hidroxipiridona e o péptido ou a proteína estar na gama de 0,1:1 a 10:1.

10 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender associar um péptido ou uma proteína fisiologicamente activos e uma hidroxipiridona, que é:

(1) uma 3-hidroxi-2-piridona ou uma 3-hidroxi-4-piridona, na qual o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto está substituído por um grupo acilo alifático, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um ou mais substituintes seleccionados a partir dos grupos acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo e hidroxil e, opcionalmente, na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um grupo acilo alifático, alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxil, por um grupo hidrocarboneto alifático, ou por um grupo hidrocarboneto alifático substituído por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxil, ou um seu sal;

(2) uma 1-hidroxi-2-piridona na qual um ou mais dos átomos de hidrogénio ligados aos átomos de carbono do anel estão substituídos por um substituinte seleccionado a partir dos grupos acilo alifático, amida alifática, ciano, éster alifático, halogéneo e hidroxil, grupos alcoxi e cicloalcoxi e grupos alcoxi e cicloalcoxi substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, amida alifática, éster alifático, halogéneo ou hidroxil e grupos hidrocarboneto alifático e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo alcoxi, cicloalcoxi, éster alifático, halogéneo ou hidroxil, mas excluindo os compostos nos quais a dita

70 989

132479

-20-

substituição dos átomos de hidrogénio só é efectuada por substituintes seleccionados a partir dos grupos hidrocarboneto alifático, grupos halogéneo e grupos hidrocarboneto alifático substituídos por um grupo halogéneo ou um seu sal; ou

(3) um composto no qual dois ou mais anéis, seleccionados a partir de 3-hidroxi-pirid-2-onas, 3-hidroxi-pirid-4-onas e 1-hidroxi-pirid-2-onas, estão covalentemente ligados aos anéis que mantêm os seus grupos hidroxil e oxo adjacentes; com um diluente ou veículo fisiologicamente aceitável.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a composição compreender uma insulina ou um produto sanguíneo ou ser uma vacina.

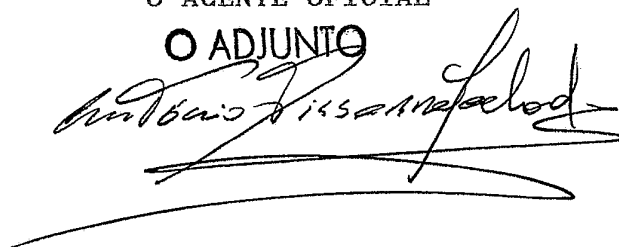
12 - Processo de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado por a hidroxipiridona ser definida como em qualquer uma das reivindicações 4 a 8.

Lisboa, -7 MAI 1990

Por NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



António Sáiz de Sá

