

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
100 111 T		92.02.08	

Requerente (71):

BIOMEASURE, INC., norte-americana (Estado de Massachusetts), com sede em 9-15, Avenue "E", Hopkinton, Massachusetts 01748, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

Inventores (72):

Arthur R. Bogden e Jacques-Pierre Moreau, ambos residentes nos EUA

Reivindicação de prioridade(s) (30)

Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido
1991/02/08	US	652.863

Figura (para interpretação do resumo)

Epígrafe: (54)

COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO DE UM MAMÍFERO SOFRENDO DE DOENÇA PROLIFERATIVA DA PELE, BENIGNA OU MALIGNA, COMPREENDENDO UM ANÁLOGO DE SOMATOSTATINA

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

Descreve-se uma composição para o tratamento de um mamífero sofrendo de doença proliferativa da pele, benigna ou maligna, compreendendo uma quantidade eficaz de um análogo de somatostatina contendo seis ou mais aminoácidos, formulada com um excipiente apropriado para administração tópica ao referido mamífero.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

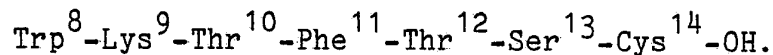
(00537/055PT1)

1 COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO DE UM MAMÍFERO SOFRENDO DE  
DOENÇA PROLIFERATIVA DA PELE, BENIGNA OU MALIGNA,  
5 COMPREENDENDO UM ANÁLOGO DE SOMATOSTATINA

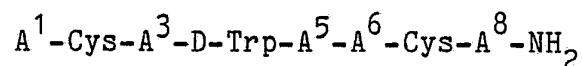
### 10 Antecedentes do Invento

Este invento refere-se ao uso terapêutico de somatostatina e de péptidos análogos à somatostatina.

15 A somatostatina é um tetradecapéptido de ocorrência natural, tendo a sequência de aminoácidos seguinte:



25 Está descrita na literatura e patentes, uma série de análogos de somatostatina, incluindo análogos contendo menos do que os catorze aminoácidos de ocorrência natural. Por exemplo, Coy e al., na Patente dos E.U.A. Nº 4.853.371, aqui incorporada para referência, descreve octapéptidos tendo um  $\text{NH}_2$  no terminal-C, e D-Trp na posição 4;



30 Um composto preferido tem D- $\beta$ -naftil alanina(D- $\beta$ -Nal) nas posições 1 e/ou 3; Tyr na posição  
35

3; e Val na posição 6. (Na presente memória descritiva, sempre que se indicar qualquer configuração, pretende-se designar o isômero L).

### Sumário do Invento

Os Requerentes descobriram que as doenças proliferativas da pele, benignas ou malignas, como melanomas e metástases de pele malignas de melanoma, se traduzem em receptores de somatostatina; e desenvolveram um método de tratamento de um mamífero (p. ex., um ser humano) sofrendo de tais doenças proliferativas da pele, por administração tópica de uma quantidade eficaz de um análogo de somatostatina contendo seis ou mais aminoácidos, p.ex., numa substância veicular inerte, farmacologicamente aceitável, à superfície de pele afectada. O análogo pode estar presente na substância veicular numa concentração de, p.ex., pelo menos 10 mg/ml. O análogo pode ser aplicado repetidamente à pele doente para se atingir uma dosagem aproximada de  $125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de pele/dia.

Os análogos de somatostatina têm, preferivelmente, uma sequência de quatro ou mais aminoácidos com, pelo menos, 20 % de homologia com a região do núcleo da somatostatina. A região nuclear é constituída por aminoácidos nas posições 7, 8, 9 e 10 da sequência de somatostatina de ocorrência natural acima mostradas. Mais preferivelmente, os análogos de somatostatina têm uma sequência de seis ou sete aminoácidos tendo, pelo menos, 20 %, e, mais preferivelmente, pelo menos 50 %, de homologia com a região do núcleo da somatostatina. Tam como é aqui usado, o termo "análogo de somatostatina" inclui somatostatina de ocorrência natural com 14 aminoácidos, como se refere nos Antecedentes do Invento, acima descritos.

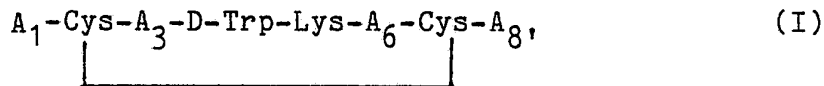
Uma classe de análogos de somatostatina

64.403

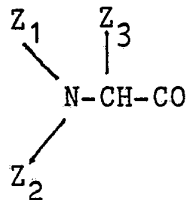
Ref: Biomrasure-Melanoma

(00537/055PT1)

1 que é adequada ao método de terapia das doenças prolifera-  
 5 tivas de pele do presente invento inclui octapéptidos da fórmula



na qual  $A_1$  é D-Phe, N-Ac-D-hArg(Et)<sub>2</sub>-Gly, D- -Nal,



15 na qual  $Z_1$  e  $Z_2$  são, independentemente, H, alquilo  $C_1\text{-}C_{12}$ , fenilalquilo  $C_7\text{-}10$ ,  $R_1\text{CO}$  (em que  $R_1$  é alquilo  $C_1\text{-}20$ , alcenilo  $C_3\text{-}20$ , alcinilo  $C_3\text{-}20$ , fenilo, naftilo ou fenilalquilo  $C_7\text{-}10$ ), ou  $R_2\text{OCO}$  (em que  $R_2$  é alquilo  $C_1\text{-}10$  ou fenilalquilo  $C_7\text{-}10$ ); desde que, quando um de  $Z_1$  ou  $Z_2$  for  $R_1\text{CO}$  ou  $R_2\text{OCO}$ , o outro seja H;

25  $R_3$  é  $\text{CH}_2\text{-}Z_4$  (em que  $Z_4$  é pentafluorofenilo, naftilo, piridilo, fenilo, ou fenilo substituído nas posições o-, m- ou, mais preferivelmente, na posição p-, sendo o substituinte um halogéneo,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NO}_2$ , OH ou alquilo ( $C_1\text{-}3$ );

30  $A_3$  é Phe, X-Phe substituído nas posições o-, m- ou, mais preferivelmente, p-, (em que X é um halogéneo, H,  $\text{NH}_2$ , OH ou alquilo  $C_1\text{-}3$ ), pentafluoro-Phe,  $\beta$ -Nal, Tyr ou Thr;

35  $A_6$  é Thr, Ser, Phe, Val, ácido  $\alpha$ -aminobutírico ou Ile, desde que, quando  $Z_3$  for fenilo,  $Z_1$  seja H,

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

27 NOV 1992

1

e  $Z_2$  for H, Ag não seja Val; e

5

$A_8$  é Thr-NH<sub>2</sub>, Trp-NH<sub>2</sub>, L- $\beta$ -Nal-NH<sub>2</sub> ou Thr-(ol) é NHCH(CH<sub>2</sub>OH)CHOHCH<sub>3</sub>); ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

10

O termo "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a actividade biológica desejada do composto correspondente, e não confere efeitos toxicológicos indesejáveis, como seja um sal de adição de ácido ou base. O termo "hArg" refere-se a homo-arginilo.

15

Na fórmula I apresentada acima, a configuração da molécula no átomo de carbono ao qual  $Z_3$  está ligado não é indicada, para mostrar que o resíduo aminoácido de que  $Z_3$  é um substituinte pode ter a configuração D- ou L-.

20

Como se mostra na fórmula I, os análogos de somatostatina octapéptidos úteis ao presente invento têm, preferivelmente, D-Trp na posição 4.

25

Os compostos da supracitada fórmula I preferidos incluem D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys-Tyr-Lys-Val-Cys- $\beta^3$ -Nal-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\alpha$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; N-Ac-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D- $\beta$ -Nal-Cys-pentafluoro-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- $\beta$ -Nal-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys- $\beta^3$ -Val-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\alpha$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\alpha$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; e acetil-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\beta$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>. Os compostos que têm um terminal-N aromático e lipofílico têm a vantagem adicional de uma actividade in vivo de longa duração.

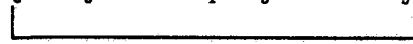
35

Outros análogos de somatostatina octapéptidos preferidos, abrangidos pela fórmula I e adequados para uso no presente invento, são;

D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Trp-Cys-Thr(ol) (SMS 201-995);



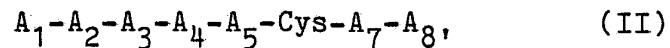
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH<sub>2</sub> (RC-160);



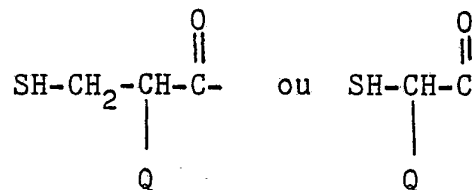
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub> (RC-121)



Outros análogos de somatostina adequados para o presente invento são hexapéptidos como; ciclo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe) que se verificou ter as propriedades biológicas da somatostina; e ciclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe), que é 50-100 vezes mais potente do que a somatostina de ocorrência natural na inibição da libertação de insulina, glucagona e hormona de crescimento.



na qual A<sub>1</sub> é



(em que Q é H ou um grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

1

A<sub>2</sub> é um X-Phe substituído na posição o-; m- ou p- ou X-D-Phe (em que X é H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1-3</sub> ou alcoxi C<sub>1-3</sub>);

5

A<sub>3</sub> é X-Trp, X-D-Trp, α-N-metil-X-Trp ou -N-Metil-D-X-Trp (em que X é um substituinte no anel benzeno, e é H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1-3</sub> ou alcoxi C<sub>1-3</sub>);

10

A<sub>4</sub> é Lys, α-N-Metil-Lys ou ε-N-R<sub>1</sub>-Lys (em que R<sub>1</sub> é alquilo C<sub>1-3</sub>);

A<sub>5</sub> é Val ou Thr;

15

A<sub>7</sub> é Pro ou

$$\begin{array}{c} Z \quad O \\ | \quad | \\ -N-CH-C- \\ | \\ T \end{array}$$

20

em que Z é H ou CH<sub>3</sub>, e T é H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH(CH<sub>3</sub>)OH, isobutilo, benzilo (substituído nas posições o-, m- ou p- com H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1-3</sub> ou alcoxi C<sub>1-3</sub>); CH<sub>2</sub>-β-naftilo (substituído no anel benzeno com H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1-3</sub> ou alcoxi C<sub>1-3</sub>); ou CH<sub>2</sub>-piridilo (substituído no anel benzeno com H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1-3</sub> ou alcoxi C<sub>1-3</sub>); e

30

A<sub>8</sub> é



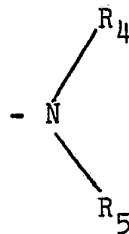
35

64.403

Ref: Biomeasure-Melanona

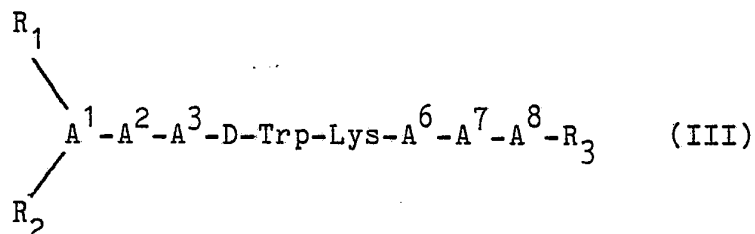
(00537/055PT1)

1 (em que  $R_2$  é H ou alquilo  $C_1-C_3$ ),  $CH_2OH$ ,  
 5  $CH_2OCR_3$  (em que  $R_3$  é alquilo  $C_1-C_3$ , aralquilo  $C_8-C_{12}$ ,  
 ou fenoxilo) ou



(em que  $R_4$  é H ou alquilo  $C_1-C_3$ , e  $R_5$  é H, al-  
 quilo  $C_1-C_3$ , fenilo ou aralquilo  $C_7-C_{10}$ ); ou um seu sal  
 farmacêuticamente aceitável.

15 Outras formulas de octapéptidos ade-  
 quados ao presente invento referem-se a análogos de somatos-  
 tatina linear.



25 na qual  $A^1$  é um isómero D de qualquer de Ala, piridil-  
 -Ala, Leu, Ile, Val, Met, Nle, Trp,  $\beta$ -Nal, o-X-Phe  
 (em que X é H,  $CH_3$ , Cl, Br, F, OH,  $OCH_3$  ou  $NO_2$ ), p-  
 -X-Phe (em que X é H,  $CH_3$ , Cl, Br, F, OH,  $OCH_3$  ou  $NO_2$ ),  
 2,4-dicloro-Phe ou pentafluoro-Phe;

30  $A^2$  é qualquer de Ala, piridil-Ala, Leu, Ile,  
 Val, Met, Nle, Trp,  $\beta$ -Nal, o-X-Phe (em que X é H,  
 $CH_3$ , Cl, Br, F, OH,  $OCH_3$  ou  $NO_2$ ), 2,4-dicloro-Phe ou  
 pentafluoro-Phe;

35  $A^3$  é qualquer de Ala, piridil-Ala, Leu, Ile,



64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma  
(00537/055PT1)

27 MAR 1992

1 Val, Met, Nle, Trp, Tyr, -Nal, o-X-Phe (em que X é  
H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que  
X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-  
5 -Phe ou pentafluoro-Phe;

5 A<sup>6</sup> é qualquer de Ala, piridil-Ala, Leu, Ile,  
Val, Lys, Met, Nle, Thr-R<sub>4</sub>, Trp, Ser-R<sub>4</sub>, -Nal,  
o-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>),  
p-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>),  
10 2,4-dicloro-Phe ou pentafluoro-Phe;

15 A<sup>7</sup> é qualquer de Ala, piridil-Ala, Leu, Ile,  
Val, Met, Nle, Trp, -Nal, o-X-Phe (em que X é H,  
CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X  
é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-  
ro-Phe ou pentafluoro-Phe;

20 A<sup>8</sup> é um isómero D ou L de qualquer de Ala,  
piridil-Ala, Leu, Ile, Ser-R<sub>4</sub>, Thr-R<sub>4</sub>, Val, Met, Nle,  
Trp, -Nal, o-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH,  
OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X = CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F,  
OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-Phe ou pentafluoro-Phe;

25 R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, são independentemente, qualquer de  
H, acilo inferior, ou alquilo inferior; e R<sub>3</sub> é H, NH<sub>2</sub>  
ou alquilo inferior; desde que, pelo menos, um de A<sup>1</sup> e  
A<sup>8</sup> seja um aminoácido aromático; e, ainda, desde que, se  
A<sup>2</sup> ou A<sup>7</sup> forem um aminoácido aromático, A<sup>8</sup> não seja  
um aminoácido aromático, e ainda, desde que R<sub>4</sub> não seja  
nada ou seja carbo-hidrato, como por exemplo, C<sub>x</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>y</sub>,  
30 em que X é 1-18 e y é 1-16, ligado pelo grupo hidro-  
xilo de Ser ou de Thr; ou um seu sal farmacologicamente a-  
ceitável.

35 Para uso, aplica-se uma quantidade  
terapeuticamente eficaz do análogo de somatostatina ao lo-  
cal da pele doente, ou combina-se com um excipiente ou subs

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma  
(00537/055PT1)

27 MAI 1992

1      tância veicular, farmacologicamente aceitável, como, por e.  
um creme gel, loção ou unguento, espalhável, para formar  
um composto terapêutico que assegura o transporte do análogo  
5      go através da pele. A penetração do análogo de somatostati-  
tina no tecido doente pode ser consumada por uma variedade  
de métodos conhecidos dos peritos neste campo.

10      Por exemplo, o análogo pode ser aplicado directamente ou misturado com uma substância veicular e depois friccionada mecanicamente na pele, numa área afectada que permita ao análogo penetrar na pele. O análogo pode também ser contido em lipossomas que são aplicados mecanicamente à pele doente. Além disso, o análogo de somatostatina pode ser incorporado num emplastro transdérmico que é aplicado à pele doente. A penetração obtida com estes métodos é, de preferência, reforçada com um agente libertador transdérmico químico, tal como dimetilsulfóxido (DMSO) ou o agente tensio-activo não iónico, n-decilmethylsulfóxido (NDMS), como se descreve em Choi et al., Pharmaceutical Res., 7(11); 1099-1106 (1990). Além disso, a penetração do análogo de somatostatina através da pele pode realizar-se por iontoforese, por mistura do análogo com uma substância veicular contendo iões negativos ou positivos, e por incorporação do composto terapêutico resultante num emplastro. a composição terapêutica pode, também, ter a  
15      forma de uma formulação de libertação sustentada biodegradável para administração tópica à zona da pele doente.

20      O método de tratamento tópico do invento proporciona uma terapia eficaz para doenças proliferativas da pele, como, p. ex., melanomas e metástases de pele malignas de melanomas, em dosagens elevadas não têm efeitos secundários tóxicos significativos.

25      Outros aspectos e vantagens do invento tornar-se-ão evidentes a partir da descrição subsequente das suas formas de realização preferidas bem como a  
30      35

64.403

Ref: Biomeasure/Melanoma  
(00537/055PT1)

1 partir das reivindicações.

5 Descrição das formas de realização do invento

Em primeiro lugar descrevem-se sumariamente os desenhos.

Desenhos

10 A Fig. 1 é um gráfico que ilustra o efeito do análogo de somatostatina (referido, ço gráfico, como "BIM23014C") no crescimento de um melanoma B16-F10.

15 A Fig. 2 é uma série de fotografias mostrando a progressão do crescimento do melanoma num rato tratado com BIM23014C nos dias 4, 7 e 11.

A Fig. 3 é uma série de fotografias mostrando a progressão do crescimento do melanoma num rato de controlo, nos dias 4, 7 e 11.

20 Estrutura

Os compostos adequados para tratamento de doenças proliferativas da pele são os análogos de somatostatina descritos no Sumário do Invento acima apresentado. São exemplos de análogos preferidos os seguintes:

25 D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (ol); D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; e  
30 D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- $\beta$ -Nal; ("Nal" refere-se a naftilalanina).

Outros análogos de somatostatina ad-  
quados incluem a somatostatina tetra-decapéptida de ocorrência natural e os análogos descritos em Coy et al., nas Patentes dos E.U.A. N<sup>os</sup> 4.904.642, 4.871.717 e 4.853.371

Ref: Biomeasure-Melanoma  
(00537/055PT1)

1 Freidinger et al., nas Patentes dos E.U.A. Nºs 4.360.516  
e 4.310.518; Nestor, EPA 0.363.589; e Bauer et al.,  
5 nas Patentes dos E.U.A. Nº 4.395.403; todas aqui incor-  
poradas para referência.

### Síntese

10 Segue-se a síntese de um análogo de  
somatostatina octapéptida. Podem preparar-se outros análo-  
gos introduzindo, no método sintético seguinte, modifica-  
ções apropriadas, que cabem nas capacidades dos especialis-  
tas na matéria.

15 O primeiro passo na preparação da  
D- $\beta$ -nafilalanina-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub> foi a  
preparação do intermediário de resina terc-butiloxicarbo-  
nil- $\beta$ -naftilalanina-S-metilbenzil-Cys-Tyr-D-Trp-N<sup>E</sup>-benzi-  
loxycarbonil-Lys-Val-S-metilbenzil-Cys-O-benzil-Thr-ben-  
zi-hidrilaminina, comose segue.

20 Colocou-se a resina benzi-hidri-  
laminina-poliestireno (Vega-Biochemicals, Ind.), na forma de  
ião de cloreto, no vaso reaccional de um sintetizador de  
péptido Beckman 990B, programado para executar o seguin-  
te ciclo reaccional; (a) cloreto de metileno; (b) ácido  
25 trifluoroacético a 33 % em cloreto de metileno (2 vezes du-  
rante 1 e 25 min. cada); (c) cloreto de metileno; (d)  
etanol; (e) cloreto de metileno; (f) trietilamina a 10%  
em clorofórmio.

30 Agitou-se a resina neutralizada com  
Boc-O-benzil-treonina e di-siopropilcarbodi-imida (1,5 m-  
mole cada) em cloreto de metileno durante 1 h; e o aminoáci-  
do resultante foi, depois, reciclado através dos passos  
de (a) a (f) do programa de lavagem acima descrito. Acopla-  
35 ral-se então os aminoácidos seguintes (1,5 mmole), suces-  
sivamente, pelo mesmo procedimento; Boc-S-metilbenzil-

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma  
(00537/055PT1)

1 -Cys, Boc-Val. Boc-Ne-benziloxycarbonil-lisina, Boc-  
-D-Trp, Boc-Tyr, Boc-S-metilbenzil-Cys, Boc-D- $\beta$ -naftil  
alanina.

5 Lavou-se e secou-se a resina, e de-  
pois misturou-se com anisolo (4 ml) e fluoreto de hidrogé-  
nio anidro (36 ml), a 0°C, agitando-se durante 45 min. (po-  
de, também, usar-se tioanisolo, ácido trifluoroacético, e  
10 ácido trifluorometanossulfônico, numa razão de 1:90:9,  
durante 6h). Evaporou-se o excesso de fluoreto de hidro-  
gênio rapidamente, sob uma corrente de azoto seco, precipi-  
tando-se o péptido livre que se lavou com éter. Dissolveu-  
-se então o peptido em bruto em 800 ml de ácido acético a  
15 90 %, ao qual se adicionou I<sub>2</sub> em metanol até se obter uma  
cor castanha permanente. Agitou-se a solução durante 1 h  
antes de se remover o solvente em vácuo. Dissolveu-se o  
óleo resultante num volume mínimo de ácido acético, a 50 %  
e eluiu-se numa coluna (2,5 x 100 mm) de Sephadex G-25.  
20 Reuniram-se, então, fracções contendo um componente maiori-  
tário por absorção uv e cromatografia de camada fina  
(tlc), evaporaram-se até se obter um pequeno volume, e  
aplicaram-se a uma coluna (2,5 x 50 cm) de octadecilsila-  
no Whatman LRP-1 (15-20  $\mu$ M).

25 Eluiu-se a coluna com um gradiente  
linear de 10-50% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético  
a 0,1 % em água. Examinaram-se fracções por tlc e cro-  
matografia líquida da alta eficiência analítica (hplc) e  
seleccionaram-se para obtenção da pureza máxima; se deseja  
30 do, poderia preparar-se um sal diferente, como p.ex., aceta-  
to ou fosfato. A liofilização repetida da solução a partir  
de água deu 170 mg do produto na forma de um pó branco.

35 Verificou-se por hplc e tlc que o  
produto era homogéneo. A análise de aminoácido de um hi-  
drolizado ácido confirmou a composição do octapéptido.

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

1 Os octapeptidos do invento tendo as  
fórmulas pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-  
-NH<sub>2</sub>, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\beta$ -aminobutírico-  
5 -Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; N-Ac-D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-  
-Thr-NH<sub>2</sub>; D- $\beta$ -Nal-Cys-pentafluoro-Phe-D-Trp-Lys-Val-  
-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- $\beta$ -Nal-  
-NH<sub>2</sub>; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- $\beta$ -Nal-NH<sub>2</sub>;  $\alpha$ -Nal-  
-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\alpha$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>;  
10 D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  $\alpha$ -aminobutírico-Cys-  
-Thr-NH<sub>2</sub>; e acetil-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-ácido  
 $\alpha$ -aminobutírico-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, foram produzidos de acordo  
com métodos análogos aos acima descritos. Podem usar-se  
15 métodos semelhantes para sintetisar os hexa-, hepta- e  
outros octapeptidos úteis no presente invento. Além dis-  
so, os métodos sintéticos descritos nas Patentes dos E.U.A.  
N<sup>os</sup> 4.360.516, 4.310.518 e 4.395.403 são aqui incorpora-  
dos para referência.

20 Resposta dos Xenó-enxertos de Melanoma de  
B16-F10 Implantados Intradermicamente à  
Somatulina BIM-23014C Aplicada Tópicamente

25 Implantação de Melanoma: Implantaram-se em dezoito ratinhos, nus, fêmeas, atímicos, deriva-  
dos de BALB/c, intradermicamente (ID), e no flanco di-  
reito, 0,02 a 0,05 ml de uma suspensão de células de mel-  
noma B16-F10, propagadas in vitro e suspensas numa solu-  
ção salina normal. A implantação fez-se com uma agulha de  
30 calibre 23 ligada a uma seringa de 1,0 ml, no dia 0. Um tal  
implante ultradérmico do melanoma B16-F10 de murino é es-  
sencialmente ortopédico e origina um tumor de crescimento  
extremamente rápido. No dia 2 já eram visíveis crescimen-  
tos melanóticos planos no local da injeção. As lesões as-  
semelhavam-se a melanomas in situ.

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

27 JUN 1992

1

5

10

15

20

25

30

35

Mod:71 - 20.000 ex. - 90/08

Tratamento: Adicionou-se Somatuli-  
ne (D- $\beta$ -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>, disponíveis  
na Biomeasure, Inc. sob o código do produto BIM-23014C)  
a DMSO a 50 % em solução salina, numa concentração de 10  
mg/ml. Depois de se esfregar a pele com uma compressa de  
gase molhada em álcool isopropílico, aplicou-se uma gota  
(aproximadamente 0,05 ml) da solução de Somatulina à su-  
perfície da pele dos ratinhos, sobre a lesão melanónica.  
Esfregou-se a solução na pele durante aproximadamente, 1  
minuto com um dedo enluvado com latex (Baxter Scientific  
Products/Flexam). Mais de metade da gota de Somatulina não  
foi absorvida, perdendo-se no processo de fricção. Os  
ratinhos para controlo foram tratados, de modo idêntico,  
com DMSO a 50 % em solução salina, sem qualquer análogo de  
somatostatina. Aplicaram-se tratamentos tópicos duas vezes  
por dia, durante 11 dias, começando no terceiro dia após a  
implantação.

RESULTADOS DO TRATAMENTO

<u>Nº do</u> <u>Grupo</u>	<u>Tratamento</u>	<u>Peso do Tumor</u> <u>(mg) no Dia 12</u>	<u>% de T/C</u>
1	Veículo de DMSO/ solução salina 0,05 ml, tópico, b.i.d. q.d. 3-14	531,6 ± 205	-
2	BIM 23014C, 0,05 ml tópico de Veículo de DMSO/solução salina de BIM- -23014C, b.i.d. q.d. 3-14	185,9 ± 47	35

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

27.11.1992  
al

1

5

10

A Fig. 1 mostra as curvas de crescimento do tumor para a experiência acima descrita. As Fig. 2 e 3 mostram fotografias de lesões melanóticas em ratinhos tiradas nos dias 4, 7 e 11. As fotos da Fig. 2, e as curvas de crescimento de tumor na Fig. 1 mostram a clara inibição do crescimento da lesão melanótica provocada pela solução de Somatulina, em comparação com as curvas do controlo na Fig. 1 e com as lesões não tratadas nos ratinhos para controlo mostradas na Fig. 3.

### Terapia

15

20

25

O invento proporciona tratamento efectivo para doenças proliferativas da pele, benignas e malignas, pelo uso dos análogos acima descritos, e hexapéptidos de somatostatina ou análogos superiores em geral, quando administrados como sedescreve. As doenças da pele, benignas e malignas, acima descritas incluem melanomas e metástases de pele malignas de melanoma, cerratoses de recorrência, pegetóide de epiteloma celular, basal, não invasivo e carcinoma de células basais. Os análogos de somatostatina podem ser administrados directamente à pele doente ou podem ser usados como tratamento subsequente a após a excisão cirúrgica ou radioterapia do tumor primário, para impedir recorrência.

30

Ceratoses incluem pré-epiteliomas, ceratoses actínicas (devidas a exposição prolongada ao Sol) e ceratoses devidas a envelhecimento. Os análogos de somatostatina pode, também, ser administtrados para tratamento preventivo, p. ex., das ceratoses actínicas e de envelhecimento.

35

Outras concretizações cabem nas reivindicações seguintes.



64.403

Ref; Biomeasure-Melanoma

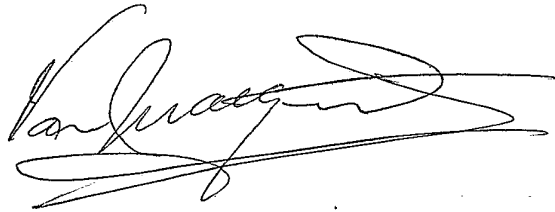
(00537/055PT1)

1

Lisboa, 27 MAI 1992

5

Por BIOMEASURE, INC.



10

**VASCO MARQUES LEITE**  
Agente Oficial  
da Propriedade Industrial  
Cartório - Arco da Concelção, 3, 1.º - 1100 LISBOA

15

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

20

25

30

35

18.12.1992

1

## = REIVINDICAÇÕES =

5

1a. - Composição para o tratamento de um mamífero sofrendo de doença proliferativa da pele, benigna ou maligna, caracterizada por compreender cerca de 10 mg/ml de um análogo de somatostatina contendo seis ou mais aminoácidos, preparada com um excipiente apropriado para administração tópica de pelo menos cerca de 125 µg do referido análogo por cm<sup>2</sup> de pele doente do referido mamífero e por dia.

10

2a. - Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatostatina compreender uma sequência de quatro aminoácidos possuindo pelo menos 20% de homologia com a região do núcleo de somatostatina.

15

3a. - Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o análogo de somatostatina compreender uma sequência de seis ou sete aminoácidos possuindo pelo menos 20% de homologia com a região do núcleo de somatostatina.

20

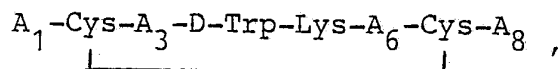
4a. - Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por a sequência possuir pelo menos 50% de homologia com a região do núcleo de somatostatina.

25

5a. - Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatostatina possuir D-Trp na posição 4.

30

6a. - Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatostatina ser um octapeptído da fórmula:



35

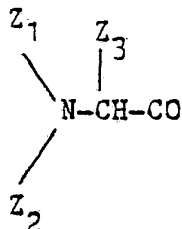
64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

31 DEZ. 1992

em que  $A_1$  é D-Phe, N-Ac-D-hArg (Et)<sub>2</sub>-Gly, D-β-Nal, ou



em que cada  $Z_1$  e  $Z_2$ , independentemente, é H, alquilo C<sub>1-12</sub>, fenilalquilo C<sub>7-10</sub>, R<sub>1</sub>CO (em que R<sub>1</sub> é alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>3-20</sub>, alquinilo C<sub>3-20</sub>, fenilo, naftilo, ou fenilalquilo C<sub>7-10</sub>), ou R<sub>2</sub>OCO (em que R<sub>2</sub> é alquilo C<sub>1-10</sub> ou fenilalquilo C<sub>7-10</sub>), com a condição de quando  $Z_1$  ou  $Z_2$  é R<sub>1</sub>CO ou R<sub>2</sub>OCO, o outro deve ser H;

$Z_3$  é CH<sub>2</sub>-Z<sub>4</sub> (em que Z<sub>4</sub> é penta fluorofenilo, naftilo, piridilo, fenilo ou o-, m- ou, de preferência fenilo p-substituído, em que o substituinte é halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, ou alquilo C<sub>1-3</sub>;

$A_3$  é Phe, o-, m- ou, de preferência, X-Phe p-substituído (em que X é halogéneo, H, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH ou alquilo C<sub>1-3</sub>), pentafluoro -Phe, β-Nal, Tyr, ou Thr;

$A_6$  é Thr, Ser, Phe, Val, ácido α-aminobutírico, ou Ile, com a condição de quando  $Z_3$  é fenilo,  $Z_1$  é H e  $Z_2$  é H,  $A_6$  não pode ser Val; e

$A_8$  é Thr, NH<sub>2</sub>, Trp-NH<sub>2</sub>, L-β-Nal-NH<sub>2</sub>, ou Thr(oil); ou um sal eficaz sob o ponto de vista farmacêutico.

7ª - Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o análogo de somatostatina ser

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

31. DEZ. 1982

1

D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol).



5

8ª - Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por análogo de somatostatina ser

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH<sub>2</sub>.



10

9ª - Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o análogo de somatostatina ser

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>.



15

10ª - Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o octapéptido ser

D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>,



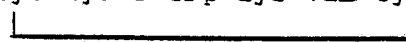
20

ou um sal farmacêuticamente aceitável.

25

11ª - Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o octapéptido ser

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH<sub>2</sub>.



30

12ª - Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatostatina ser ciclo(pro-Phe-D-Trp-Lys-Trp-Phe).

35

13ª - Composição de acordo com a

64.403

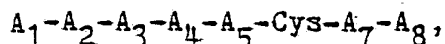
Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

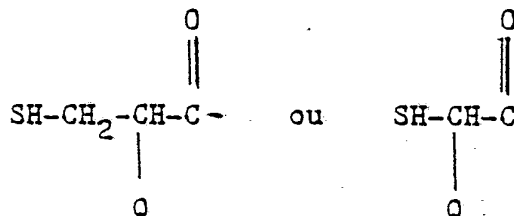
01.02.1982

reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatos-  
tatina ser ciclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe).

14ª - Composição de acordo com a  
reivindicação 1, caracterizada por o análogo de somatos-  
tatina ser um heptapeptido da fórmula



em que  $A_i$  é



(em que Q é H ou um grupo alquilo  $C_1-C_8$ );

$A_2$  é o-, m-, ou X-Phe ou X-D-Phe p-substituído  
(em que X é H, halogéneo,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NO}_2$ , OH, alquilo  
 $C_1-C_3$ , ou alcoxi  $C_1-C_3$ );

$A_3$  é X-Trp, X-D-Trp,  $\alpha$ -N-metil-X-Trp, ou  $\alpha$ -N-metil-  
-D-X-Trp (em que X é um substituinte no anel benzénico  
e é H, halogéneo,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NO}_2$ , OH, alquilo  $C_1-C_3$ , ou  
alcoxi  $C_1-C_3$ );

$A_4$  é Lys,  $\alpha$ -N-metil-Lys, ou  $\epsilon$ -N- $R_1$ -Lys (em que  $R_1$  é  
alquilo  $C_1-C_3$ ),

$A_5$  é Val ou Thr;

$A_7$  é Pro ou

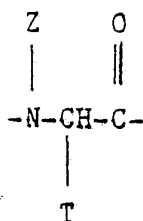
64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

31. DEZ. 1992

1



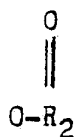
5

em que Z é H ou CH<sub>3</sub> e T é H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH(CH<sub>3</sub>)OH, isobutilo, benzilo (substituído nas posições o-, m- ou p- por H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, ou alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CH<sub>2</sub>-β-naf-tilo (substituído no anel benzénico por H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, ou alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>-piridilo (substituído no anel benzeno, por H, halogéneo, NH<sub>2</sub>, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ou alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; e

10

15

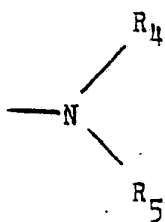
A<sub>8</sub> é



20

(em que R<sub>2</sub> é H ou alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OCR<sub>3</sub> (em que R<sub>3</sub> é alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, aralquilo C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>, ou fenóxi), ou

25



30

(em que R<sub>4</sub> é H ou alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> e R<sub>5</sub> é H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; fenilo ou aralquilo C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>); ou um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

35

15ª - Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o análogo de somatosta-

64.403

Ref: Biomeasure-Melanona

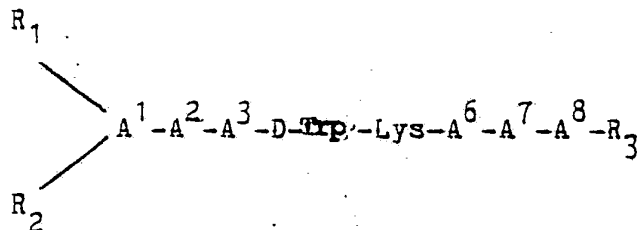
(00537/055PT1)

31/08/1992

1

tina ser um octapeptido da fórmula

5



10

em que

15

A<sup>1</sup> é um isómero D de qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Val, Met, Nle, Trp, β-Nal, o-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-Phe, ou pentafluoro-Phe;

20

A<sup>2</sup> é qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Val, Met, Nle, Trp, β-Nal, o-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub> ou NO<sub>2</sub>), 2,4-cloro-Phe, ou pentafluoro-Phe;

25

A<sup>3</sup> é qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Val, Met, Nle, Trp, Tyr, β-Nal, o-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>); 2,4-dicloro-Phe, ou pentafluoro-Phe;

30

A<sup>6</sup> é qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Val, Lys, Met, Nle, Thr-R<sub>4</sub>, Trp, Ser-R<sub>4</sub>, β-Nal, o-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-Phe, ou pentafluoro-Phe;

35

A<sup>7</sup> é qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Val,

64.403

Ref: Biomeasure-Melanoma

(00537/055PT1)

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Met, Nle, Trp,  $\beta$ -Nal, o-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X é H, CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-Phe, ou pentafluoro-Phe;

<sup>8</sup> é um isómero D ou L de qualquer Ala, piridil-Ala, Leu, Ile, Ser-R<sub>4</sub>, Thr-R<sub>4</sub>, Val, Met, Nle, Trp,  $\beta$ -Nal, o-X-Phe (em que X é CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), p-X-Phe (em que X = CH<sub>3</sub>, Cl, Br, F, OH, OCH<sub>3</sub>, ou NO<sub>2</sub>), 2,4-dicloro-Phe, ou pentafluoro-Phe; cada um de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, independentemente, é qualquer H, acilo inferior, ou alquilo inferior; e R<sub>3</sub> é H, NH<sub>2</sub>, ou alquilo inferior; na condição de pelo menos um de A<sup>7</sup> e A<sup>8</sup> poder ser aminoácido aromático; e além disso na condição de tanto A<sup>2</sup> como A<sup>7</sup> ser um aminoácido aromático, A<sup>8</sup> não poder ser um aminoácido aromático; e ainda na condição de R<sub>4</sub> poder ser nada ou poder ser hidrato de carbono, por exemplo, C<sub>x</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>y</sub>, em que x é um número compreendido entre 1-18 e y entre 1-16 ligados através do grupo hidroxilo de Ser ou Thr; ou um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Lisboa, 31. DEZ. 1992

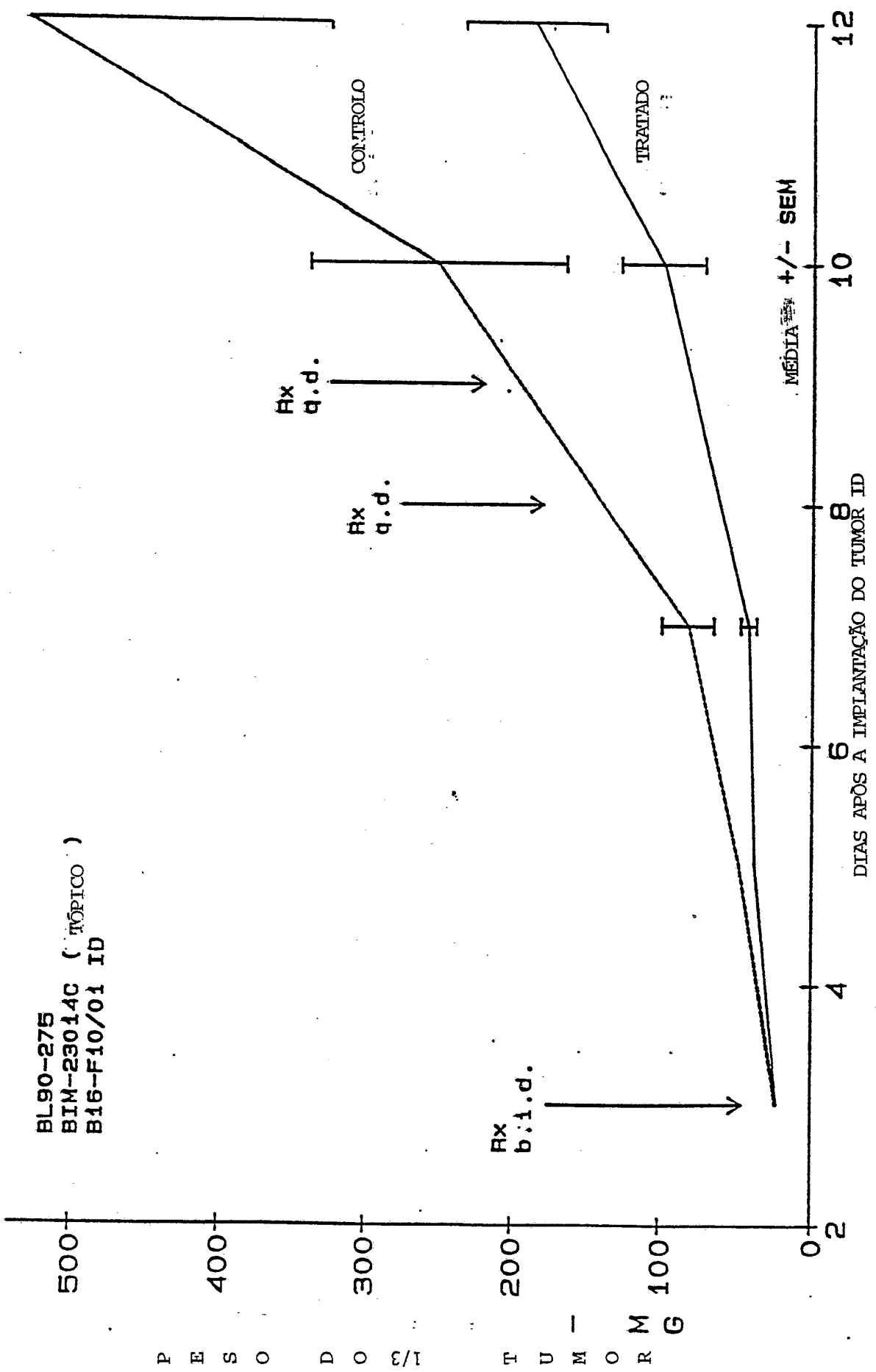
Por BIOMEASURE, INC.

VASCO MARQUES LEITE  
Agente Oficial  
de Propriedade Industrial  
Cartório - Arco da Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

Mod. 21 - 20.000 ex. - 9/92



27 MAR 1992  
[Signature]



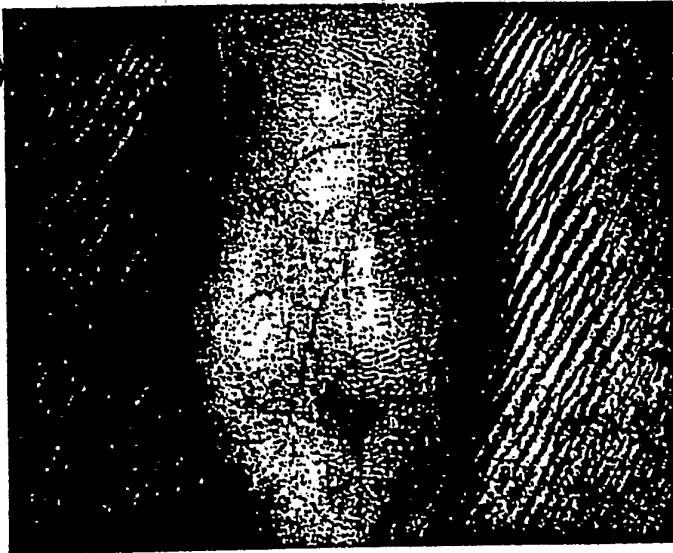
EXPERIÊNCIA # 1

*[Handwritten signature]*



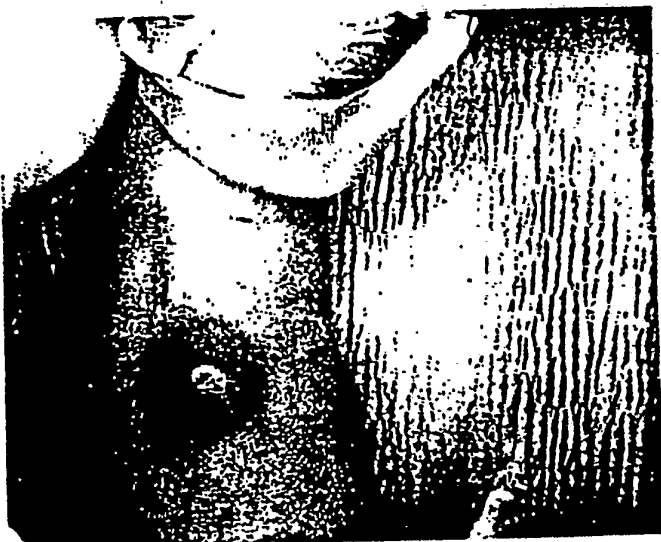
AN. # 8 TRATADO - 4o dia

T D4



AN. # 8 TRATADO - 7o. dia

T D7



AN. # 8 TRATADO - 11o. dia

T D11

22 JUN 1992  
*al*

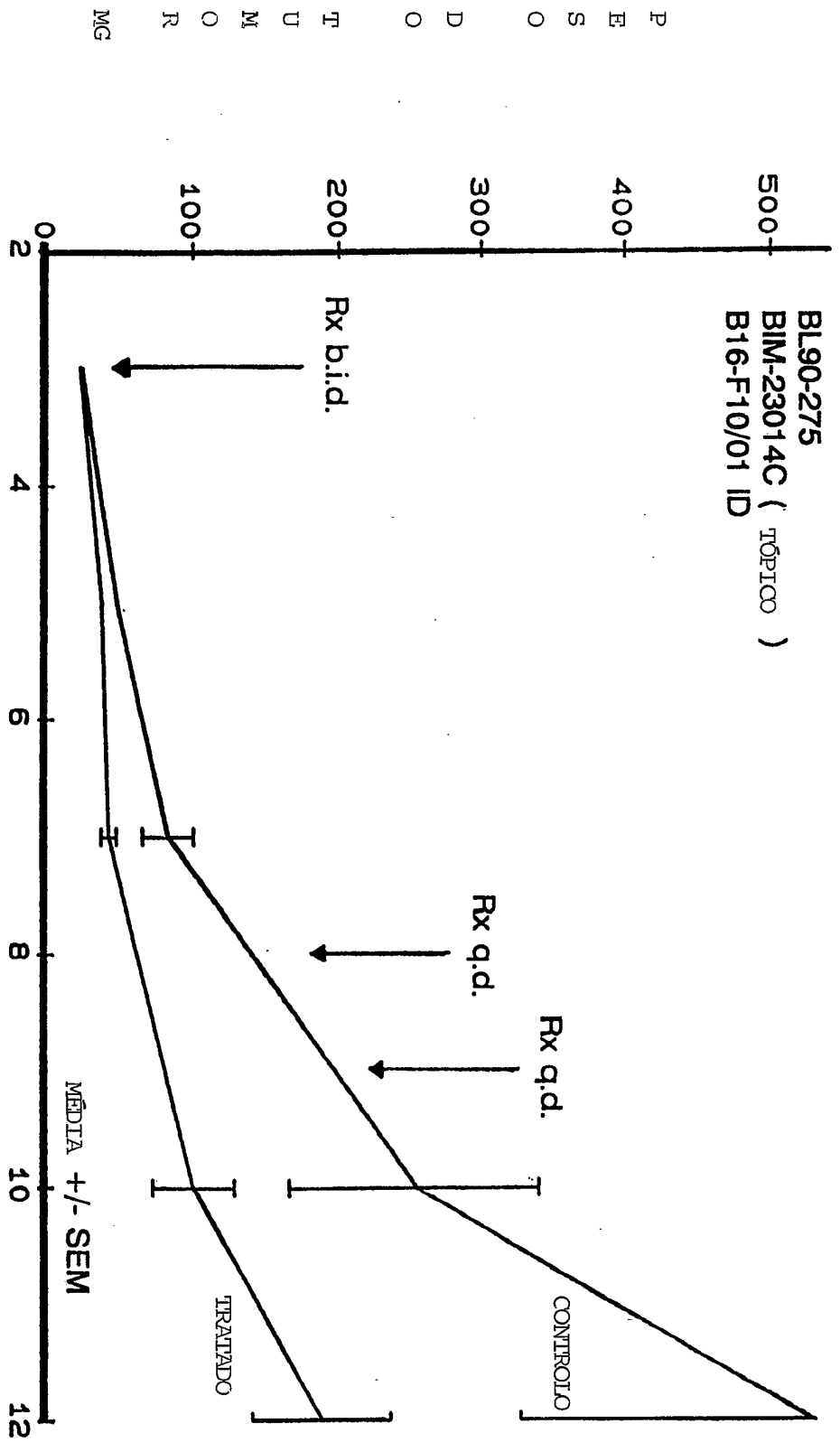


FIG. 1

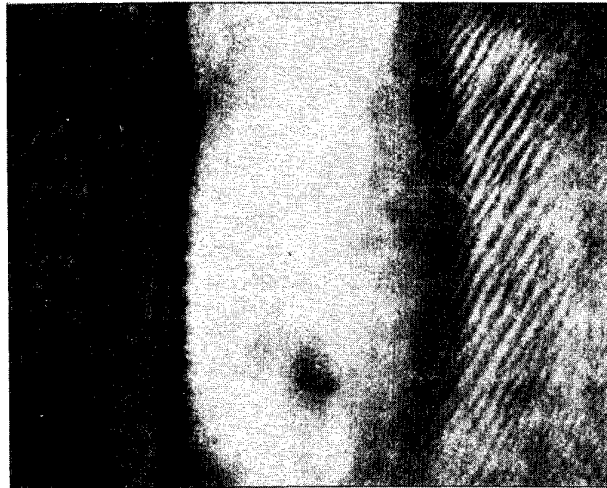


27 JUN 1992  
u'g



AN. #8 TRATADO - 4º DIA

T D4



AN. #8 TRATADO - 7º DIA

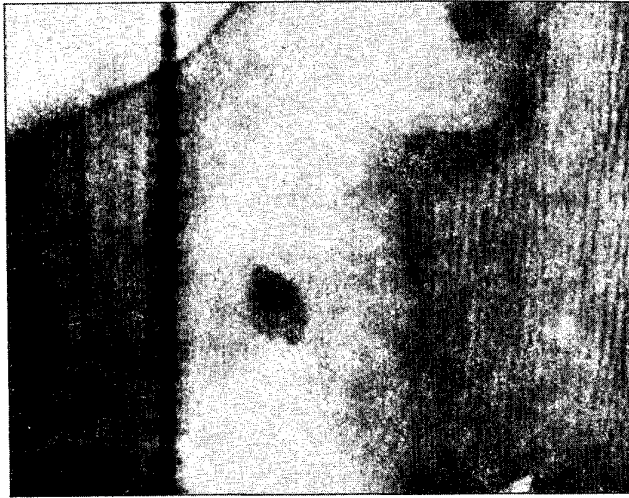
T D7



AN. #8 TRATADO - 11º DIA

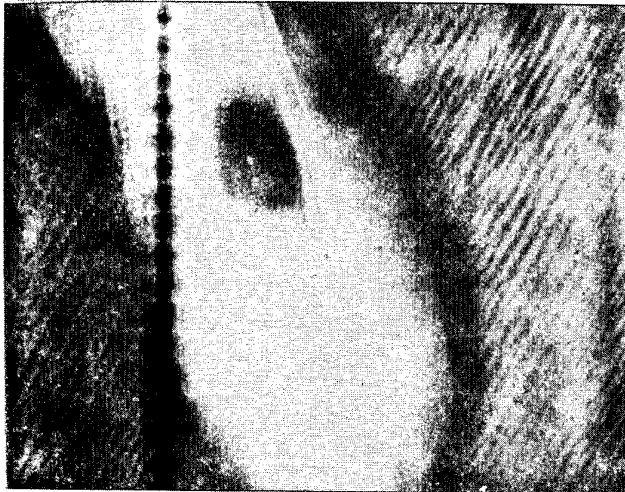
T D11

25 JUN 1992



CONTROLO AN. #1 - 4 ° DIA

C D4



CONTROLO AN. #1 - 7 °.DIA

C D7



CONTROLO AN. #1 - 11 °DIA

C D 11