

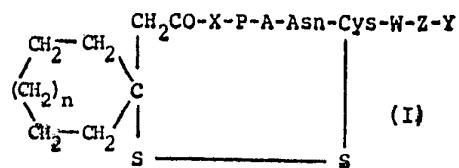
"Processo de preparação de octapeptídos vasopressina-antagonistas"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

Certos octapéptidos, que tem estruturas caracterizadas por serem um anel com seis unidades cíclicas peptídicas com uma cauda dipeptídica à qual falta uma unidade glicina na posição 9, tem potente actividade antagonista da vasopressina. Os antagonistas cílicos octapeptido são preparados usando a ciclização de um di-mercaptop para formar o anel ditio. Uma importante espécie do grupo é l(ácido β -mercapto- β , β -ciclopentametile no propiónico)-2-(0-etyl-D-tirosina)-4-valina-8-arginina-9-desglicina vasopressina.





-2-

DESCRIÇÃO DO INVENTO

Esta invenção refere-se a um processo de preparação de novos octapéptidos cíclicos que são vasopressina-antagonistas. Os compostos preparados usando esta invenção são 9-desGly-vasopressina (VSP) antagonistas ou 9-desGly-1-Pmp-vasopressinas. Mais especificamente, as estruturas destes octapeptídos tem um ácido β -mercapto- β , β -cicloalquilenopropiônico e cinco unidades de aminoácido ciclizadas num anel de 6 unidades por meio de um enxofre derivado de uma unidade de cisteína e um enxofre, da unidade de ácido propiônico. O anel também tem uma cauda dipéptido distinta, que não tem uma unidade glicina, presa a uma unidade 6-cisteína por meio de uma ligação amido.

M. Manning, W. H. Sawyer e colaboradores tem publicado uma série de publicações descrevendo vários congêneres de $\text{[1-(ácido } \beta \text{ -mercapto- } \beta \text{, } \beta \text{ -ciclopentametilenopropiônico)-4-valina } \text{7-arginina-vasopressina}$ que tem actividade anti-vasopressina. São representativos disto EPA Nº. 61.356, Nº. 4 367 225 e Patente U.S. Nº. 4 399 125.

Todos os compostos de Manning tem uma cadeia tripéptido ligada à unidade 6 e são, portanto, nonapéptidos. Os presentes compostos distinguem-se além disso por serem octapéptidos, por terem uma cauda dipéptido des-Gly ligada à unidade 6 e por terem potente actividade vasopressina-antagonista.

A potente actividade biológica dos compostos da presente invenção é inesperada visto que a des-glicinamida⁹-vasopressina e a des-lisina⁸-desglicinamida⁹-vasopressina $\text{[T. Barth et al., Collection Czechoslov. Chem. Commun. 39, 506 (1974)]}$ tal como a desglicina⁹-oxitocina $\text{[B. Berde e al., Handb. Exp. Pharm. 23 860 (1968)]}$ retêm uma pequena parte da actividade dos seus respetivos parentados compostos. De facto, Barth relata que a des-glicinamida⁹-AVP tem actividade CNS mas praticamente nenhuma actividade antidiurética ou uterotónica, Belgian Patent No.896 509.

Certas designações da arte dos péptidos usadas nas especificações e reivindicações são as seguintes: Cap, ácido β -mercapto- β , β -cicloalquilenopropiônico; Pmp, ácido β -mercapto- β , β -ciclopentametilenopropionico; Chg, ciclohexilglicina; Abu, ácido α -amino-n-butírico; Cha, ciclohexilalanina; Pba, ácido aminofenilbutírico; Gln, glutamina; Gly, glicina; Tyr,



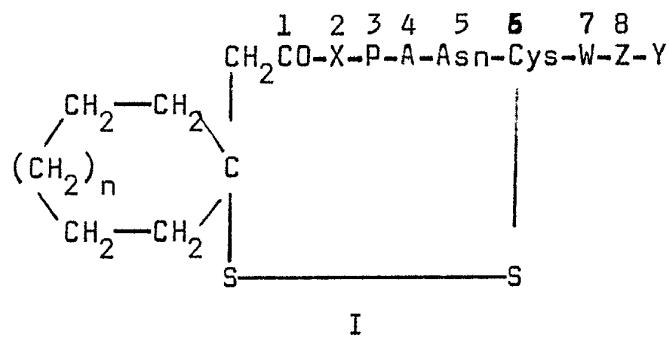
-3-

tirosina, Phe, fenilalanina; Phe(4'-Alk), alquilfenilalanina inferior; Val, valina; Nva, norvalina; Ile, isoleucina; Nle, norleucina; D-Alle, D-allo-isoleucina; Leu, leucina; Ala, alanina; Lys, lisina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Met, metionina; Tos, tosilato; HF, ácido fluorídrico; BHA, benzidrilamina; DIEA, diisopropiletilamina; 4-MeBzl, 4-metilbenzilo; TFA, ácido trifluoroacético; DCC, diciclohexilcarbodiimida; HBT, 1-hidroxibenzotriazolo; ADH hormona antidiurética; ACM, acetamidometilo; DMAP, dimetilaminopiridina.

Quando o termo "vasopressina" é utilizado, somente na especificação, significa L-arginina vasopressina (AVP) excepto quando alterado. Os derivados AVP deste invento têm preferência. "Alk" representa um alquilo inferior de 1-4 carbonos que é opcionalmente ligado ao azoto em Y, ao oxigénio substituinte da unidade de tirosina quando aquele está presente na posição 2 ou ao anel fenilo da unidade fenilalanina na posição 3 do anel. Aqueles substituintes alquilo incluem metilo, etilo, n-propilo, isopropilo ou butilo.

Por isso, na descrição aqui incluída e nas reivindicações, utiliza-se a nomenclatura comum na arte da química dos peptídos e da vasopressina. Quando não é assinalada nenhuma configuração, a unidade amino-ácido está na forma L ou naturalmente ocorrente.

Os compostos desGly⁹ do invento são ilustrados pela seguinte fórmula de estrutura



na qual:

P é Phe ou Phe(4'-Alk);

X é D-Phe, D-Val, D-Nva, D-Leu, D-Ile, D-Alle, D-Pba, D-Nle, D-Cha, D-Abu, D-Met, D-Chg, D ou L-Tyr ou D ou L-Tyr(alk);

Y é NH₂, NHAlk, NH₂Bzl ou OH;

W é D-Pro, L-Pro ou ΔPro (dehidro-Pro);



-4-

A é Val, Ile, Abu, Ala, Gly, Lys, Cha, Nle, Phe, Leu, Chg ou Nva;

Z é D-Arg, L-Arg, D-Lys ou L-lis;

n é 0, 1 ou 2, ou um sal aceitável farmaceuticamente, éster prodroga ou seu complexo.

Um grupo subgenérico de compostos deste invento compreendem compostos de fórmula I na qual X é D-Tir, D-Cha, D-Phe, D-Ile, D-Leu, D-Val, ou D-Tir(Et); P é Phe ou Phe(4'-Et), A é conforme definido acima, Y é NH₂; W é Pro, Z é Arg e n é 1.

Os compostos de fórmula I nos quais X é D-Tir(Et) são antagonistas ADH particularmente activos como são os congêneres amida⁸.

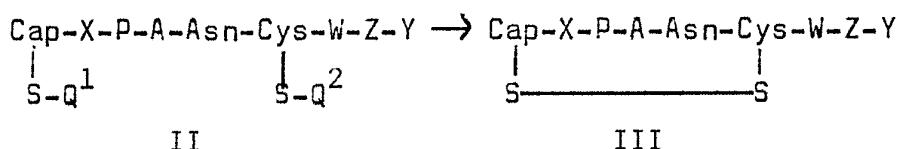
Os compostos individuais com interesse são $\text{[}\text{L-}(\text{ácido } \beta\text{-mercaptopo- } \beta, \beta\text{-ciclopentametilenopropiónico})\text{-2-D-tirosina-4-}\text{valina-8-arginina-9-desglicina]}$ vasopressina, $\text{[}\text{L-}(\text{ácido } \beta\text{-mercaptopo- } \beta, \beta\text{-ciclopentametilenopropiónico})\text{-2-D-tirosina-4-}\text{valina-8-arginina-9-desglicinamida]}$ vasopressina e, especialmente, $\text{[}\text{L-}(\text{ácido } \beta\text{-mercaptopo- } \beta, \beta\text{-ciclopentametilenopropiónico})\text{-2-(0-etyl-D-tirosina)-4-valina-8-arginina-9-desglicina]}$ vasopressina.

Estão também incluídos neste invento vários derivados dos compostos de fórmula I tais como sais de adição, prodrogas na forma éster ou amida e complexos. Os sais de adição podem ser quer sais com catiões farmaceuticamente aceitáveis tais como NH₄⁺, Ca⁺⁺, K⁺ ou Na⁺ no grupo terminal ácido (Y = OH) ou com um sal farmaceuticamente aceitável num centro básico do péptido (como nas unidades Arg). As formas de sal acetato são especialmente úteis embora os cloretos, brometos e sais de outros ácidos fortes sejam úteis. Os compostos, também, formam sais internos ou iões zwitter como quando Y é OH. As formas éster prodroga são por exemplo, ésteres alquilo inferiores de ácidos de fórmula I a qual tem de 1-8 carbonos no radical alquilo ou ésteres aralquilo tais como vários ésteres benzilo. Outros derivados latentes dos compostos de fórmula I serão óbvios para aqueles que são peritos na arte. "Complexos" incluem vários solvatos tais como hidratos ou alcoolatos ou aqueles com resinas de suporte, tais como uma resina Merrifield.

Os compostos de fórmula I são preparados por ciclização de um octapeptido linear por meio de dois grupos mercapto, na



unidade cisteína (Cys) na posição 6 e na unidade ácido β -mercapto- β , β -cicloalquilenopropiônico (Cap) na posição 1. A reacção de ciclização ocorre imediatamente na presença de um agente de oxidação brando capaz de oxidar um mercapto a dissulfureto. A reacção representa-se como segue:



na qual:

X, P, A e Y são conforme definido na fórmula I, acima;

Z é conforme definido na fórmula I acima ou também pode ser uma ligação simples sempre que Y é OH;

W é como definido para a fórmula I acima ou também pode ser OH sempre que Z e Y estão ausentes; e

Q^1 e Q^2 são, cada um, hidrogénio ou um grupo deslocável.

Os intermédios de fórmula II são novos compostos e são uma parte desta invenção. Os compostos de fórmula III na qual W e Z ou ambos estão ausentes são também novos compostos úteis como intermediários conforme descrito abaixo. O último tem actividade antagonista VSP num nível mais baixo do que a dos octapeptídos.

A reacção de ciclização desta sequência de reacções é a mais proveitosamente conduzida por oxidação. Qualquer agente de oxidação conhecido da arte para conseguir converter um dimercapto em dissulfureto, pode ser usado. São exemplos de tais agentes um ferricianeto de metal alcalino, especialmente ferricianeto de potássio ou sódio, oxigénio gasoso, diiodometano ou iodo.

Como exemplo, o ferricianeto de potássio é adicionado ao dimercaptan de fórmula II dissolvido num solvente inerte adequado, por exemplo, água ou metanol aquoso à temperatura de 0-40°C. Muitas vezes, a oxidação é a um pH de 7-7,5 à temperatura ambiente em solução diluída dando bom rendimento, 40-50%, de composto cíclico.

Os compostos de fórmula III que são compostos Cys(OH)⁶ ou Pro(OH)⁷ reagiram com um dipéptido, um (NH₂)-WZY protegido, ou um amino-ácido, (NH₂)-Z-Y, respectivamente, conforme descrito daqui em diante.

A matéria prima mercaptan linear pode ter ou não grupos



-6-

deslocáveis ou protectores comuns à arte (Q^1 e Q^2) presentes em várias unidades de amino-ácidos. Aqueles grupos protectores incluem benzilo, p-metoxi-benzilo, l-adamantilo, t-butilo, p-nitro-benzilo, tritilo, benziltiometilo, etilcarbamoilo ou acetamidometilo. Benzilo, adamantilo ou t-butilo são removidos pelo mercúrio (halo) sais de acetato em metanol aquoso a 0-80°C. O grupo protector é usualmente removido antes da ciclização tal como durante o fendimento do ácido sulfídrico do péptido da resina de suporte. Ele pode, contudo, ser removido quer durante a ciclização ou, no local, antes da ciclização.

Os grupos S-acetamidometilo são especialmente úteis. Por exemplo, S-ACM-Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-S-ACM-Cys-Pro-OBzl foi tratado com carbonato de potássio em metanol aquoso para dar o peptido Pro ácido linear com 78-84% de rendimento. Este foi, então, ciclizado por oxidação usando iodo em metanol aquoso para dar o produto desejado Pro(OH)⁷ com 65-70% de rendimento. Alternativamente, o produto protegido foi ciclizado sob as mesmas condições com tratamento inicial de iodo seguido pela remoção do carbonato de potássio do radical éster protector. O ácido Pro⁷ foi, então, condensado com Arg(NH₂)₂, usando DCC e DMAP em DMF a 0-20° para dar o Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg(NH₂) com 45% de rendimento.

O iodo, portanto, remove o grupo S-protector, especialmente o grupo ACM e cicliza o intermediário. O acetato de mercúrio ou o acetato de chumbo também remove o grupo ACM para dar um mercapto de metal. Este é convertido em tiol, no local, por tratamento com ácido sulfídrico e, então, oxidado numa fase em separado.

O octapéptido cíclico desejado de fórmula I pode ser convenientemente isolado por acidificação da mistura aquosa de oxidação tal como usando ácido acético glacial, e passando a mistura de reacção sobre uma coluna cromatográfica troca-iões (permutedora de iões) por exemplo, sobre uma coluna de resina acrílica fracamente ácida com eluição ácida, ou por filtração de gel sobre uma cama formada com gel preparada por ligação cruzada de dextran com epiclorohidrina.

Como alternativa à ciclização dos intermediários lineares de fórmula II sugerida acima, os ácidos 6-Cys ou 7-Pro ciclizados (os de fórmula I na qual ou ambas as unidades de cauda,



W e Z, ou somente uma unidade da cauda, Z, estão ausentes) são condensados com um dipeptido protegido, W-Z-Y, ou com um amino-ácido, Z-Y, respectivamente. A reacção do ácido Cys ou do ácido Pro com um amino ácido ou dipeptido adequadamente protegidos é conduzida usando qualquer reacção em que se forma amida, comum à arte dos peptidos. Usualmente, fazem-se reagir quantidades substancialmente equimoleculares das matérias primas na presença de uma carbodiimida, tal como a diciclohexilcarbodiimida, mais 1-hidroxibenzotriazolo ou dimetilaminopiridina num solvente orgânico entre 0-35°C, de preferência, desde o gelo até à temperatura ambiente. Os grupos protectores são removidos por uma reacção que não irá romper a ligação dissulfureto do anel hexapeptido, por exemplo, alcali fraco.

Os intermediários importantes de fórmula II são convenientemente preparados usando métodos de fase sólida de síntese de péptido conforme discutido em M. Manning e outros, *J. Med. Chem.* 25 46 (1982). Uma resina de suporte benzidrilamina comercial (BHR) é usada para preparar os produtos finais de fórmula I em que Y é NH₂ (as des-glicinas) e uma resina de suporte clorometilo (CMR) é usada para preparar os compostos de fórmula I nos quais Y é OH (as des-glicinamidas).

A cadeia peptídica dos péptidos lineares da fórmula II é construída, pouco a pouco, partindo da unidade 8 em direcção à unidade 1. Cada unidade é protegida convenientemente conforme é sabido na arte dos peptidos e como é descrito mais abaixo. Alternativamente, vários oligopeptidos podem ser constituídos usando reacções de líquidos ou de suportes, e depois condensados como um último passo na sequência da reacção para preparar os intermediários dimercapto.

A sequência preferida das reacções da fase de suporte de resina é conduzida convenientemente num sintetizador de péptidos Beckman 990 B sem isolamento de cada péptido intermédio. Os detalhes do processo são apresentados aqui a seguir nos exemplos de trabalho. As condições, de solução ou reacção enzimática são aplicáveis aqui conforme é sabido na arte.

Os vários amino-ácidos, que são adicionados consecutivamente à cadeia de resinas suporte são protegidos como é sabido na arte. Por exemplo, o grupo de protecção Boc é usado para um grupo amino especialmente na posição α ; um benzilo opcional-

mente substituído, para os grupos mercapto nas unidades Pmp e Cys; tosilo, para a unidade Arg; e um carbobenzoxilo (Z) opcionalmente substituído para as unidades Tyr ou Lys. Os grupos protectores serão, mais convenientemente, aqueles que são facilmente removidos, isto é, usando tratamento ácido para o grupo terc.-butiloxicarbonilo, sódio líquido amónia ou hidrogenação catalítica para os grupos benzilo ou carbobenzoxilo onde as condições da reacção de remoção não conduzem à reacção em outras porções do peptido tais como a ligação dissulfureto.

Como outros exemplos de grupos protectores, o grupo amino de um amino ácido ou oligopeptido é protegido convencionalmente por um grupo acilo tal como formilo, trifluoroacetilo, ftaloílo, p-toluenossulfonilo ou o-nitrofenilsulfonilo; um grupo benziloxicarbonilo tal como benziloxicarbonilo, o-bromobenziloxicarbonilo, p-bromobenziloxicarbonilo, o- ou p-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenziloxicarbonilo ou p-metoxibenziloxicarbonilo, um grupo alifático oxicarbonilo tal como tricloroestiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo ou diisopropilmetoxicarbonilo ou um grupo aralquiloxicarbonilo tal como 2-fenilisopropoxicarbonilo, 2-tolilisopropoxicarbonilo, ou 2-p-difenilisopropoxicarbonilo. Grupos amino são também protegidos formando enaminas por reacção com uma 1,3-dicetona tal como benzoilacetona ou acetilacetona.

Os grupos carboxilo podem ser protegidos pela formação de amida, formação de hidrazida ou por esterificação. Se necessário o grupo amida é substituído pelo grupo 3,4-dimetoxibenzilo ou pelo grupo bis-(p-metoxifenil)-metilo. O grupo hidrazida é substituído por benziloxicarbonilo, tricloroestiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo, tritilo ou 2-p-difenil-isopropoxicarbonilo. O grupo ester é substituído por um alanol como o metanol, etanol, t-butanol ou cianometilalcool; por um aralcanol como o benzilalcool, benzidrilalcool, benzoilmetilalcool, p-bromobenzoilmetilalcool ou o p-clorobenzoilmetilalcool; por um fenol como o 2,4,6-triclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol ou o 2,4-dinitrofenol; ou por um tiofenol como o tiofenol ou o p-nitrotiofenol. O grupo hidroxilo na tirosina é opcionalmente protegido por esterificação ou eterificação. Um grupo protegido por esterificação é, por exemplo, um grupo O-acetil-, O-benzoil-, O-benziloxicarbonil- ou O-estiloxicarbonil-. Um grupo protegido por eterificação é, por



exemplo, um grupo O-benzil-, O-tetrahidropiranil- ou O-t-butil-.

O grupo amino do grupo guanidino na arginina pode ser protegido pela formação de um sal, pelo grupo nitro, tosilo, benziloxicarbonilo ou mesitileno-2-sulfonilo. Nem sempre, porém, é necessário proteger o grupo guanidino.

O péptido linear protegido intermédio é separado da matriz portadora de resina, por exemplo, pela amónia num solvente alcoólico e depois é tratado para remover grupos protectores usando por exemplo sódio-amoníaco líquido. Este processo dá o derivado amida do octapéptido linear.

Mais conveniente será combinar as duas operações tratando o péptido fixado sobre resina com ácido fluorídrico anidro na presença de um catião "varredor" ("scavenger") adequado, como é conhecido na arte, tal como o anisolo, para dar o octapéptido intermédio de fórmula II, na forma de dimercaptan e com bom rendimento.

Os compostos deste invento têm potente actividade vasopressina-antagonista. Sabe-se que a vasopressina para o mecanismo de acção anti-diurética no rim. Quando a acção destes compostos antagoniza a da hormona anti-diurética natural (ADH), o corpo excreta água devido a um aumento de permeabilidade das porções terminais dos tubos renais. Julgamos que o mecanismo de acção esteja nos vasopressina-receptores V_2 -receptores localizados sobre a membrana do plasma de certas células epiteliais renais. O efeito farmacodinâmico mais notável dos ADH-antagonistas do invento é o diurético de água mais do que um natriurético como por exemplo a tiazida.

Os compostos reivindicados têm como objecto qualquer paciente que sofra do sindroma de secreção hormonal antidiurética inadequada ("Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion" - SIADH) ou de um estado edematoso indesejável. São exemplos de estados clínicos indicados para os compostos deste invento a hipertensão, cirrose hepática, falência cardíaca congestiva ou um componente de qualquer estado traumático resultante de dano sério ou doença nos quais seja factor relevante o agnismo da vasopressina que ocorre naturalmente aos receptores mediados pela VSP.

O segundo grupo de locais vasopressina-receptores é o dos locais de pressores vasculares (V_1 -receptores) localizados dentro

-10-

do próprio sistema cardiovascular. Por exemplo, o Composto 5 do Quadro I, baixo, foi ensaiado, com o protocolo Dyckes (U.S. Pat. Nº. 4 367 255) quanto à inibição da vasoconstrição induzida pela Vasopressina no rato, *in vitro* (pA_2 8,40) e *in vivo* (pA_2 7,71). O antagonismo no receptor V_2 resultou em vasodilatação e, por fim, em actividade anti-hipertensora. O tratamento da dismenorreia é outra aplicação dos compostos deste invento quando administrados endovenosamente ou por via intranasal.

Os compostos deste invento são portanto usados para tratar edema ou para expelir água em pacientes que necessitem tal tratamento, por administração parentérica ou por insuflação de uma quantidade efectiva, mas não tóxica, do composto escolhido, de preferência combinado com um suporte farmacêutico. As unidades de dosagem do ingrediente activo são escolhidas de 0,01 até 10 mg/kg, de preferência de 0,01 até 5 mg/kg, com base num paciente de 70 kg. As unidades de dosagem são aplicadas 1 a 5 vezes por dia.

A composição farmacêutica para induzir antagonismo de vasopressina contém um ingrediente activo de fórmula I sob a forma de dose unitária como acima de descreveu, dissolvida ou suspensa num suporte líquido padrão. Um suporte padrão é o soro salino isotônico, contido numa ampola ou num pequeno frasco de doses múltiplas, adequado para injeção parentérica tal como por administração endovenosa, subcutânea ou intramuscular. A composição para insuflação é semelhante mas é habitualmente administrada num inalador ou aplicador de doses medidas. As composições em pó podem também ser usadas com preparações oleosas, geles, tampões para preparações isotônicas, emulsões e aerosóis, sob forma padronizada.

Os compostos deste invento provaram ter actividade antagonista única, em relação à hormona anti-diurética natural (actividade anti-ADH), *in vitro*, no tecido medular do porco-de-en-gorda ou do rim humano e, *in vivo*, no rato ou no macaco hidropénicos. Encontram-se detalhes dos protocolos *in vitro* em F. L. Stassen et al., *J. of Pharm. Exp. Ther.*, 233, 50-54, (1982); os cálculos da actividade da ciclase e de potencial de ligação no receptor são os seguintes:

Ensaio de Avaliação da Actividade Ciclase Adenilato:



-11-

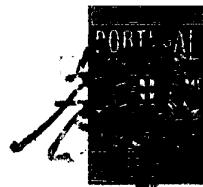
Em cada experiência a quantidade de $^{32}\text{P}/\text{cAMP}$ formada na ausência de membrana medular é avaliada e constitui o valor do "branco". Subtrai-se este valor de todos os dados experimentais. O produto é avaliado quanto ao seu efeito na actividade da ciclase adenilato basal e/ou na actividade estimulada pela vasopressina. Cada determinação é realizada em triplicado. O valor K_a é obtido a partir de um gráfico Lineweaver-Burke. Rel. $V_{max} = (V_{max} \text{ droga}/V_{max} \text{ vasopressina}) \times 100 \times K_i = I/(K_a'/K_a) - 1$ onde I é a concentração do antagonista, K_a' e K_a são as concentrações da vasopressina necessária para dar metade da actividade máxima de ciclase adenilato, na presença e na ausência de antagonista, respectivamente.

Ensaio de ligação:

Em cada experiência, a quantidade de ^3H -Vasopressina ligada na ausência e na presença de um excesso de vasopressina ($7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$), é medida em triplicado. Estes valores representam, respectivamente, a ligação total e a não-específica. A K_B de um composto resulta da equação para a inibição competitiva: $K_B = IC_{50}/(1 + L/K_D)$, onde IC_{50} é a concentração necessária para 50% de inibição da ligação específica de ^3H -vasopressina, L é a concentração do ligante e K_D é a constante de dissociação da ^3H -vasopressina ($K_D = 3,6 \times 10^{-9} \text{ M}$; 1 SD = $0,4 \times 10^{-9} \text{ M}$). Este é o valor médio de K_D determinado em 3 preparações de membranas de rim de barrasco (porco-de-engorda).

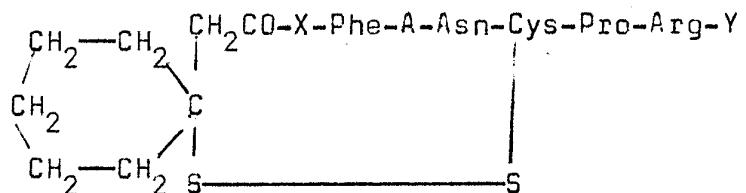
Protocolo para Ratos Hidropénicos

Retira-se a alimentação e água de ratos machos, aproximadamente 18 horas antes do ensaio. Os animais são instalados aos 4 por gaiola de metabolismo. A hora 0, o composto do ensaio é administrado intraperitonealmente ao grupo de ensaio e um volume equivalente de veículo é administrado a ambos os grupos de controle (alimentados e não alimentados). Mede-se o volume de urina e a osmolaridade em cada hora e durante 4 horas. Os valores do ensaio são expressos em ml de urina excretada (cumulativa), mEq/rato de electrólito excretado, mg/rato de ureia excretada e a osmolaridade em mili-Osmoles/kg H_2O . Usa-se o teste da tolerância para determinar a significância. Defini-se ED_{300} como a dose de produto ($\mu\text{g}/\text{kg}$) necessária para baixar a osmolaridade da urina até 300 m-Osmoles/kg. ED_{500} define-se como a dose do produto ($\mu\text{g}/\text{kg}$) necessária para baixar a osmolaridade da urina até



500 m-Osmoles/kg. O protocolo para o macaco hidropénico é semelhante.

QUADRO I



X	Y	A	atividade anti-ADH		
			in vivo (Rato)	in vitro (Porco)	ED ₃₀₀ (μg/kg)*
1. <u>D</u> -Tyr	Gly-NH ₂	Val	32	30	0,082
2. <u>D</u> -Tyr	NH ₂	Val	63	27	0,065
3. <u>D</u> -Tyr	OH	Val	156	160	0,35
4. <u>D</u> -Tyr(Et)	Gly-NH ₂	Val	9,9	5,9	0,011
5. <u>D</u> -Tyr(Et)	NH ₂	Val	5,8	3,0	0,0078
6. <u>D</u> -Tyr(Et)	NH ₂	Abu	13	7,6	0,018

* Dose estimada de péptido libertado i.p. imediatamente ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de que resulta uma redução de U_{osm} dos níveis hidropénicos até 300 m-Osmoles/kg H_2O .

O Quadro I demonstra, nos protocolos descritos, a actividade anti-vasopressina de compostos representativos escolhidos cujas estruturas de octapéptido têm a cauda desGly dipéptido que é característica deste invento. A presença de substancial actividade antagonística é inesperada pois que, nas séries de agonistas, a des-Gly-oxitocina tem um efeito oposto na pressão sanguínea quando comparada com a própria oxitocina (Ver B. Berde et al., cit. loc.) e o efeito, conhecido na arte, de encurtar a cauda linear da oxitocina e vasopressina é provocar "um marcado decréscimo das actividades biológicas típicas das substâncias" (ver T. Barth et al., cit. loc.).

Além disso, o composto 5 do Quadro I provou ter uma excepcional actividade antagonista ao longo dos vários protocolos de análise em tecido de barrasco ou humano, em ensaios *in vitro*, bem como nos ensaios do macaco e rato hidropénicos. A sua actividade anti-ADH, manifestada como a dose necessária para baixar



-13-

a osmolaridade da urina até 300M Osm/kg H₂O no ensaio do macaco esquilo ("squirrel monkey") hidropénico consciente, é ED₃₀₀ = 8,6 Nmoles/kg (i.p.). A do composto 4 do Quadro I é 33,1 Nmoles/kg. A do análogo 2-D-Phe do último composto é 319,0 Nmoles/kg.

Os seguintes exemplos destinam-se somente a ensinar a preparação dos produtos deste invento. Todas as temperaturas es tão em graus centígrados.

EXEMPLO 1

Síntese em fase sólida de Pmp(Bzl)-D-Tyr(Br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-resina

Para a síntese em fase sólida do péptido fixado em resina, do título, usou-se como matéria prima a Boc-Arg(Tos)-resina (3 mmol/5,4 gramas de resina). Os amino ácidos adequadamente protegidos foram ligados sequencialmente sobre a Boc-Arg(Tos)-resina, preparada pela reacção de Boc-Arg(Tos), sob a forma de sal de césio, com a resina comercial Merrifield (Cl-CH₂-resina), como é conhecido da arte pelo uso de um programa manual a seguir detalhado:

1. lavagem com cloreto de metileno (3 vezes, 1 minuto)
2. prelavagem com ácido trifluoroacético a 33% em cloreto de me tileno com 1% indolo (1 vez, 1 minuto)
3. desprotecção com ácido trifluoroacético a 33% em cloreto de metileno com 1% indolo (20 minutos)
4. lavagem com cloreto de metileno (3 vezes, 1 minuto)
5. prelavagem com trietilamina a 10% em cloreto de metileno (1 vez, 1 minuto)
6. neutralização com trietilamina a 10% em cloreto de metileno (10 minutos)
7. lavagem com cloreto de metileno (3 vezes, 1 minuto)
8. adição de amino ácido protegido (10 mmol) em trietilamina em cloreto de metileno e N,N'-diciclohexilcarbodiimida 0,5M em cloreto de metileno (20 ml)

O tempo de reacção foi até 2 horas.

No caso da ligação da parte Asn juntou-se 1-hidroxiben-zotriazolo (HBT, 10 mmol) com Boc-Asn em dimetilformamida seca. A dimetilformamida (DMF) seca foi também usada como solvente quando se ligou Pmp (Bzl) num péptido-resina, usando a 4-dimethylaminopiridina (10 mM). O fim de cada reacção de acoplamento foi controlada pelo ensaio da ninidrina. Usou-se o grupo 4-me-

PORTUGAL

-14-

toxibenzilo para proteger o grupo tiol da Cys e empregou-se o grupo 2-bromo-carbobenzoxilo para bloquear o hidroxilo fenólico da D-Tyr.

A resultante Pmp(Bzl)-D-Tyr(Br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-resina, protegida, foi lavada muito bem com cloreto de metileno e metanol, sucessivamente. Depois de secar no vácuo durante a noite, recolheram-se 8,4 gramas da resina protegida do título.

Preparação de Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂

Submeteu-se a Pmp (Bzl)-D-Tyr-(*p*-bromocarbobenzoxi)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-resina (4 g, ca. 1,5 mmol) a amonílise, usando solução (200 ml) de amónia saturada/metanol em dimetilformamida seca (50 ml) à temperatura ambiente durante 48 horas. Após evaporação à secura, o resíduo foi precipitado pelo acetato de etilo/n-hexano e filtrado para dar a amida de octapéptido protegido (1,54 g).

Este péptido em bruto foi dissolvido em amónia (250 ml) e tratado com solução sódio/amónia para dar Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ que foi então oxidado usando solução de ferriacetato de potássio 0,01 M em 4 l de solução aquosa a pH 7-7,5. Depois da reacção de oxidação se completar, o pH da solução aquosa foi ajustado até pH 4,5 pela adição de ácido acético glacial. Passou-se lentamente esta solução através de uma resina acrílica fracamente ácida (Bio-Rex 70) numa coluna (11×2,5 cm, forma H⁺). A coluna foi eluída com ácido acético a 5% e 50%, sucessivamente. Recolheu-se o produto ciclizado Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂ em bruto (860 mg) a partir das fracções da solução a 50% de ácido acético.

Purificação do Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂

1. Distribuição em contra-corrente:

Amostra: 860 mg de produto bruto, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5)
250 transferências

a) fr. 186-204	436 mg
b) fr. 182-185 e 205-218,	219 mg

2. Cromatografia de partição:

Amostra: 250 mg (de 1-a), G-25 fina (2,5×55 cm), n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5)

a) fr. 32-46	222 mg
--------------	--------



3. HPLC preparativa:

Amostra: 40 mg (de 2-a); Alltech C18, 3000 psig. Caudal: 3.0 ml/min.

Tampão A: 0,1% TFA

Tampão B: 0,25% TFA /CH₃CN (4:6) 60% B; isocrática; 235 nm (2,0 AUFS)

Injeção: 10 mg/0,5 ml, tamponado A.

17 mo do produto puro do título

4. Cromatografia de Permuta de Iões

Amostra: 365 mg (de 1-a e 2-a); CMC; 0,01M NH_4OAc até 0,1M NH_4OAc

Gradiente linear

a) fr. 51-70	93,5 mg
b) fr. 71-89	86,5 mg
c) fr. 91-110	65 mg
d) fr. 111-121	24,5 mg

EXEMPLO 2

Preparação de Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg

Fez-se reagir Pmp(Bzl)-D-Tyr-(br-Z)-Phe-Val-Asn-Cys(OMe-Bzl)-Pro-Arg(Tos)-resina (4,2 g; 1,5 mmol) do Exemplo 1, em 4,5 ml de anisolo destilado, com ácido fluorídrico anidro (40 ml) a 0° durante uma hora. Depois do tratamento acima descrito e de evaporar à secura em vácuo, tratou-se o resíduo com éter anidro e separou-se por filtração obtendo-se 1,33 g de péptido em bruto. Para completar a remoção do grupo Bzl da parte Pmp usou-se o sódio em amônia líquida, reacção que se descreveu no Exemplo 1. O octapéptido não-protégido resultante foi ciclizado usando uma solução de ferricianeto de potássio 0,01 M a pH 7-7,5 até que a cor persistiu por 30 minutos como acima se descreve na preparação da amida.

Recolheu-se o desglicinamida-octapéptido (600 mg) depois de acidificar a solução de oxidação com ácido acético até pH 4,5 e de passar a mistura reagente por uma coluna Bio-Rex-70 com 1 l. de ácido acético a 5% como eluente.

Purificação do Phe-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg

1. Distribuição em contra-corrente:

amostra: 600 mg de Bio-Rex 70, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5);

200 transferências

a) fr. 150-161

169 mg

-16-

b) fr. 133-149 e 162-163

2. HPLC preparativa:

Amostra: 52 mg (de 1-a); Alltech C18 (25 cms 10 mm, 10 micron);

Tampão A: 0,1% TFA

Tampão B: 0,25% TFA/CH₃CN (4:6) 60% B, isocrática; 3000 psig; 3,0 ml/min. Injeção: 10 mg/0,6 ml em tampão A. 235 nm (2,0 AUFS)

a) 24 mg

b) 7,3 mg.

Juntou-se 2a e 2b, repurificou-se em HPLC, obtendo-se 15 mg de péptido puro.

3. Cromatografia de partição:

Amostra: 117 mg (de 1-A), G-25 fina (2,5×55 cm), n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1,5)

a) fr. 32-36

83 mg de produto puro

EXEMPLO 3Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂

O composto do título foi preparado pelo método da fase sólida aplicado na benzidrilamina-resina (BHA). Assim, fez-se reagir 1,0 g de BHA-resina (1,13 mmol NH₂/g resina) com 1,5 equivalentes de Boc-Arg(Tos), 1,5 equivalentes de DCC e 3,0 equivalentes de HBT postos em dimetilformamida de modo a ficar 0,1 M em Boc-Arg(Tos). O desbloqueamento fez-se com 50% TFA/cloreto de metíleno e a neutralização com 5% DIEA/cloreto de metíleno. O péptido foi alongado, aos poucos, por acoplamento, usando anidridos simétricos de Boc aminoacílo preparados em DMF (0,1 M). Ligaram-se Boc-Asn, Boc-D-Tyr(Et) e Pmp(MBz), sucessivamente, usando DCC e HBT em DMF. O fim do acoplamento foi controlado pelo ensaio qualitativo da ninidrina e fez-se o re-acoplamento quando necessário. A Pmp (MBz)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(MBz)-Pro-Arg (Tos)-BHA-resina completa foi lavada com cloreto de metíleno e seca até peso constante, 2,34 g.

O péptido foi desbloqueado e separado da resina por tratamento com ácido fluorídrico líquido (30 ml) na presença de anisolo (4 ml) a 0° durante uma hora. Depois de evaporar até a secura em vácuo, lavou-se a resina em éter etílico, secou-se ao ar e depois extraiu-se com dimetilformamida desgasificada (3x x20 ml) e ácido acético a 20% (4x20 ml). A DMF e os extractos

-17-

ácidos foram juntos a 4 l de água (pH 4,5 com ácido acético). Ajustou-se o pH a 7,2 com hidróxido de amónio e titulou-se a solução com ferricianeto de potássio 0,01 M, em argon, com agitação até persistir uma cor amarela (85 ml). Levou-se o pH até 4,8 com ácido acético glacial. Filtrou-se a mistura e passou-se o filtrado por uma coluna (H^+) de Bio-Rex 70. Depois de lavar a coluna com água (200 ml), o péptido bruto foi eluído com 300 ml de piridina/ácido acético/água (30:4:66 v/v). Evaporou-se o eluente em vácuo a 30°. Dissolveu-se o resíduo em 100 ml de ácido acético 0,2 N, depois liofilizou-se, obtendo-se 507 mg do octapéptido, em bruto, do título.

Purificação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂

1. Distribuição em contracorrente

Amostra: 607 mg em bruto; n-BuOH:HOAc:H₂O (4:1:5), 240 transferências

a) fr. 154-170 e 190-192	71 mg
b) fr. 171-189	230 mg

2. Filtração Gel

Amostra: 123 mg de 1-b, G-15 (2,5x55 cm) usando 0,2 N HOAc, 25 ml/h

a) fr. 46-50	~ 20 mg
b) fr. 51-77	60 mg de péptido puro.

EXEMPLO 4

Preparação de Pmp-D-Leu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₃H₇

Fez-se reagir uma mistura de 0,1 mmole de (Pmp¹-D-Leu²-Val⁴-desGly-NH₂)AVP, preparada como acima mas usando Boc-D-Leu na posição 2, e de 0,1 mmole de n-propilamina em 20 ml de DMF, com 23 mg (0,11 mmol) de DCC e 14 mg (0,11 mmol) de HBT, à temperatura ambiente durante 2 horas. Evaporaram-se as matérias voláteis obtendo-se um resíduo oleoso. O produto foi purificado como acima usando: (1) filtração gel sobre G-10-Sephadex eluída com ácido acético 0,2 N; (2) cromatografia líquida de alta pressão usando 0,05% TFA em 39% acetonitrilo em água; e de novo (3) filtração gel para dar 20 mg de octapéptido puro do título.

Análises de amino ácidos: Asp 0,88, Pro 0,93, Val 1,00, Leu 1,09; Phe 0,88, Arg 1,07. HPLC = 95% pico maior a 11,33 com acetonitrilo 40% aquoso com KH₂PO₄ 0,05 M como tampão. K_{lig.} = 12,1% inibição a 10⁻⁵M.



-18-

Usando (Pmp¹-D-Tyr(Et)²-Val⁴-desGlyNH₂)-AVP, preparada como no Exemplo 2, e benzilamina obtém-se Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂z1. Preparam-se de modo semelhante outros derivados N-alquilados.

EXEMPLO 5

Síntese Peptídica em Fase Sólida de Pmp-(4-MeBz1)-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Cys(4-MeBz1)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina

Para a síntese em fase sólida do péptido fixado em resina, do título, usou-se como matéria prima Boc-Arg(Tos)BHA-resina (1,19 mmol/g de resina). Foi preparada fazendo reagir Boc-Arg(Tos), 3 mmol, com a resina de benzidrilamina, 1,0 mmol, em dimetilformamida durante duas horas. A resina de benzidrilamina sob a forma de cloridrato foi coberta com cloreto de metíleno durante a noite. Foi então lavada com cloreto de metíleno (4x1 min.) neutralizada com diisopropiletilamina 7% em cloreto de metíleno (2x2 min.), depois 6x1 min. com cloreto de metíleno sozinho e finalmente 2x1 min. com dimetilformamida pré-seca. A associação do Boc-Arg(Tos) à resina realizou-se por 2 vezes num agitador ("shaker") usando 1-hidroxibenzotriazolo (HBT, 6 mmol) e diciclohexilcarbodiimida (DCC, 3 mmol). Depois da associação executou-se, como rotina, o ensaio quantitativo da ninidrina e a análise de amino ácidos para determinar a percentagem de "carga" sobre a resina. Nesta experiência a carga foi de 62,66%, isto é, estavam disponíveis 0,74 mmol/g de resina. O amino ácido que se seguiu, Boc-Pro, foi associado usando o seguinte protocolo:

- 1 - Lavado com cloreto de metíleno (6 vezes, 1 min.)
- 2 - Prelavado com TFA 50% em cloreto de metíleno (1 vez, 1 min.)
- 3 - Desprotegido com TFA 50% em cloreto de metíleno (20 min.)
- 4 - Lavado com cloreto de metíleno (6 vezes, 1 min.)
- 5 - Prelavado com DIEA 7% em cloreto de metíleno (1 vez, 1 min.)
- 6 - Neutralizado com DIEA 7% em cloreto de metíleno (8 min.)
- 7 - Lavado com cloreto de metíleno (6 vezes, 1 min.)
- 8 - Lavado com dimetilformamida (2 vezes, 1 min.)
- 9 - Adicionado de amino ácido protegido (3 mmol) e HBT, 6 mmol, em DMF, seguido da adição de DCC em cloreto de metíleno, 3 mmol, e associação (acoplamento) durante 2 horas.
- 10 - Lavado com dimetilformamida (2 vezes, 1 min.)
- 11 - Lavado com cloreto de metíleno (4 vezes, 1 min.)
- 12 - Lavado com etanol/cloreto de metíleno (1:1) (2 vezes, 1 min.)

13 - Lavado com cloreto de metileno (4 vezes, 1 min.)

Estas operações realizaram-se no agitador ("shaker").

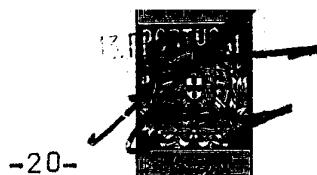
Os amino ácidos subsequentes foram acoplados sequencialmente usando o sintetizador de péptidos Beckman 990-B. O programa usado para cada acoplamento, excepto para BocAsn e Pmp(4-MeBzl), foi o seguinte:

- 1 - Lavado com cloreto de metileno (3 vezes, 1 min)
- 2 - Prelavado com TFA 50% em cloreto de metileno (1 vez, 1 min.)
- 3 - Desprotecção com TFA 50% em cloreto de metileno (30 min.)
- 4 - Lavado com cloreto de metileno (3 vezes, 1 min.)
- 5 - Prelavado com DIEA 7% em cloreto de metileno (1 vez, 1 min.)
- 6 - Neutralizado com DIEA 7% em cloreto de metileno (1 vez, 10 min.)
- 7 - Lavado com cloreto de metileno (3 vezes, 1 min.)
- 8 - Adicionados amino ácidos protegidos (3 mmol) em cloreto de metileno, seguindo-se a adição de DCC, 3 mmol, 10 ml de 0,3 M em cloreto de metileno e acoplamento durante 2 horas.
- 9 - Lavado com cloreto de metileno (3 vezes, 1 min.)
- 10 - Lavado com etanol/cloreto de metileno (1:1) (3 vezes, 1 min.)
- 11 - Lavado com cloreto de metileno (3 vezes, 1 min.)

No caso de acoplamento de Asn usou-se 1-hidroxibenzotriazolo (HBT, 6 mmol) em 10 ml de dimetilformamida 0,6 M. A dimetilformamida seca foi também usada como solvente quando se acoplou Pmp (4-MeBzl) ao péptido-resina usando a 4-dimetilaminapiridina (3 mmol). O termo de cada reacção de acoplamento foi controlado pelo ensaio da ninidina. O grupo 4-metilbenzilo (4-MeBzl) foi usado para proteger os grupos tiol da Cys e do ácido pentamilenomercaptopropiônico (Pmp).

Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina, 1,25 g (0,37 mmol) em 2 ml de anisolo, reagiu com ácido fluorídrico anidro (20 ml a 0° durante 50 min.). Após evaporação do HF no vácuo lavou-se o resíduo com eter anidro, 4x20 ml, e extraiu-se o péptido em bruto com dimetilformamida (50 ml) e ácido acético 33% (50 ml) em 2 litros de água desgasificada previamente ajustada até pH 4,5. O disulfidiloctapeptido diluído em água foi ciclizado usando solução 0,01 M de ferricianeto de potássio a pH 7,2 até a cor amarela persistir por 30 min. (50 ml). Ajustou-se o pH a 4,5 usando ácido acético



-20-

glacial e passou-se a solução através de uma coluna (2,5x12, H⁺) de resina acrílica fracamente ácida (Bio-Rex-70) lentamente. Eluiu-se a coluna com tampão de acetato de piridina (30:4:66) (piridina/ácido acético glacial/água). A solução de acetato de piridina foi removida por destilação no vácuo. O resíduo foi liofilizado a partir de ácido acético a 10% obtendo-se 300 mg (76%) do péptido do título, em bruto.

Purificação do Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

1. Distribuição em contra-corrente:

Amostra: 300 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O, 4:1:5, 240 transferências

a) fr. 176-186 99,6 mg de péptido puro

b) fr. 170-175 e 187-210 117,24 mg

Rendimento em material purificado 216,84 mg (55%).

2. Fórmula Molecular C₅₀H₇₂N₁₂O₁₀S₂

Peso Molecular: 1064,53

Análise de Amino Ácidos: Asp (1,00), Abu + Cys (1,70), Tyr (0,64), Phe (0,98), Arg (0,91).

Teor em Péptidos: 68,06-91,52% a partir da análise de amino ácidos; 87,33% a partir da análise de azo to.

3. Cromatografia

	Solvente	R _f
TLC	n-BuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc (1:1:1:1)	0,56
	n-BuOH/HOAc/H ₂ O (4:1:5) topo	0,42
HPLC	coluna-C ₁₈	K'
Isocrática	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA (60:40:0,25)	3
	0,05 MKH ₂ PO ₄ : :acetonitrilo (60:40)	7,33
Gradiente	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA de 80:20:0,25 até 50:50:0,25	8,82

Bombardamento Atómico Rápido (Fast Atom

Bombardment-FAB): m/z 1065 (M+H)⁺;

1063 (M-H)⁻

EXEMPLO 6Síntese Peptídica em Fase Sólida de Pmp-(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina

O tetrapéptido fixado em resina Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA, 0,72 g (0,36 mmol) foi sintetizado no sintetizador de péptidos Beckman 990-B partindo da Boc-Arg(Tos)-benzidrilamina-resina (0,72 mmol/g) usando um protocolo como o do Exemplo 5. Os amino ácidos subsequentes foram acoplados sequencialmente no agitador ("shaker") usando HBT e DCC durante 2 horas, de modo idêntico. Depois de ligar o último resíduo, isto é, Pmp(4-MeBzl), a resina contendo péptido foi lavada como habitualmente e seca, obtendo-se 0,88 g do intermédio do título.

Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

Fez-se reagir a Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina, em 2 ml de anisolo, com HF anidro, a 0º durante 50 minutos. O trabalho foi conduzido como habitualmente e a toma de K₃Fe(CN)₆ foi de 45 ml obtendo-se 230 mg (60,8%) do péptido em bruto do título.

Purificação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Ala-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

1. Distribuição em contra-corrente:

Amostra: 230 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5), 240 transferências

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| a) fr. 160-178 | 105,2 mg prod. puro |
| b) fr. 179-190 e 150-159 | 49,5 mg |

Rendimento em material purificado: 154,7 mg (41%)

2º Fórmula Molecular: C₄₉H₇₀N₇O₁₀S₂

Peso Molecular: 1050,449

Análise de Amino Ácidos: Asp (1,00), Pro (1,03), Ala (0,94), Cys (0,46), Tyr (0,65), Phe (0,91), Arg (0,92).

Teor em péptidos: 59,18-81,77% de 2 análises.

3. Cromatografia

	Solvente	R _f
TLC	nBuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc (1:1:1:1)	0,64
HPLC	coluna C ₁₈	K'
Isocrática	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA 60:40:0,1	2,18
Gradiente	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA de 60:40:0,1 até 50:50:0,1	6,47

Bombardeamento Atómico Rápido (FAB): m/z 1051 ($M+H$) $^+$;
 1049 ($M-H$) $^-$

EXEMPLO 7

Síntese Peptídica em Fase Sólida de Pmp(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe(4'-Et)-Val-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina

O péptido fixado em resina, do título, foi preparado a partir da BOC-Arg(Tos)-BHA-resina (0,4 mmol/g) num agitador ("shaker") usando um protocolo atrás referido, isto é, desproteção-acoplamento usando HBT e DCC durante 2 horas, até se obter Boc-Val-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina. Os dois resíduos de aminoácidos seguintes foram acoplados usando o sintetizador de péptidos Beckman 990-B. O Pmp(4-MeBzl) foi ligado manualmente usando DMAP-DCC durante a noite. O péptido contendo resina foi lavado e seco como usualmente, obtendo-se 2,00 g do produto intermédio do título.

Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe(4-Et)-Val-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

Fez-se reagir Pmp-(4-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe(4-Et)-Val-Asn-Cys-(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina, em 3 ml de anisolo, com 30 ml de ácido fluorídrico anidro a 0° durante uma hora. O desenvolvimento do trabalho foi feito como acima, com 38 ml de $K_3Fe(CN)_6$. Obtiveram-se cerca de 50 mg de péptido em bruto da coluna de Bio-Rex e 139 mg por precipitação da solução, num total de 189 mg (42,7%) do péptido do título.

Purificação:

1. Cromatografia de coluna de partição, Sephadex G-25:

Amostra: 50 mg, n-BuOH/HOAc/H₂O (4:1:5)

a) fr. A, 23,86 mg

b) fr. B, 18,5 mg

HPLC de Preparação:

Amostra: 43 mg (De 1, Fr. a + Fr. b), Altex ODS, 10 mmx25 cm, 5 μ , caudal 4 ml/min., água/acetonitrilo/TFA (50:50:0,25), isocrática, 229 nm (2,0 AUFS), injeção 2,0 mg/300 μ l e 4,0 mg/420 ml obtendo-se 30,0 mg de péptido puro.

2. Características Físicas:

Fórmula Molecular: $C_{53}H_{78}N_{12}O_{10}S_2$

Peso Molecular: 1106,47

Análise de Amino Ácidos: Asp (1,00), Pro (0,78-0,84), Cys (0,45), Val (1,02), Tyr (0,63),

-23-

Phe(*p*-Et) (1,50), Arg (1,00-0,96)

Teor em Péptidos: 73,3-89,6%

3. Cromatografia:

	Solvente	<i>R</i> _f
TLC	nBuOH/HOAc/H ₂ O/EtOAc (1:1:1:1)	0,70
	nBuOH/HOAc/H ₂ O (4:1:5) Tópico	0,299
HPLC	Coluna C ₁₈	K'
Isocrática	H ₂ O/CH ₃ CH/TFA (55:45:0,1)	4,43
Gradiente	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA de (60:40:0,1) até (50:50:0,1)	8,7
FAB	m/z 1107 (M+H) ⁺ ; 1105 (M-H) ⁻	

EXEMPLO 8Síntese de Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-MBHA-resina

Preparou-se uma milimole de Boc-Asn-Cys(4-MeBzl)-Pro-Arg(Tos)-BHA-resina usando 1 mmole de Boc-Arg(Tos)-4-metilbenzidril amina (MBHA)-resina como material de partida por acoplamento sequencial com os aminoácidos de *t*-Boc protegidos adequados num sintetizador de péptidos Beckman 990-B.

Obtiveram-se 1,83 gramas de resina de péptido protegido que foi dividida em duas partes iguais (0,915 g cada).

Síntese de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Gly-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

Uma parte da resina de péptido protegido, supra, foi depois sequencialmente acoplado com 1,5 mmoles de aminoácidos Boc adequados e de γ -(S-MeBzl)-Pmp-OH obtendo-se 1,16 g da resina de péptidos protegidos final. Obteve-se Pmp(S-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Gly-Asn-Cys(4 MeBzl)-Pro-Arg-(Tos)MBHA-resina que se secou em vácuo. Esta resina protegida foi tratada com 1,5 ml de anisólo e 25 ml de ácido fluorídrico anidro a 0° durante 1 hora. O péptido desprotegido foi tratado com 0,01 mole de solução de ferrieaneto de potássio a pH 7,2 em 2 litros de água. Usaram-se 53 ml de agente oxidante.

A solução resultante passou por uma coluna C₁₈ "flash". A coluna foi eluída com 50% de acetonitrilo com 0,25% ácido trifluoroacético em 20 ml por fracção. Isolaram-se das fracções 325 mg de produto em bruto. Nova purificação do produto por CCD



-24-

(B/A/W, 4:1:5) deu 188 mg do produto 99% puro do título.

Análise de Amino Ácidos:

Teor de péptidos	82%
Asp 1,04	Tyr 0,92
Pro 1,15	Phe 1,01
Gly 1,00	Arg 0,91
Cys 0,54	

FAB/MS = m/z ($M+H$)⁺ 1037

EXEMPLO 9

Síntese de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Chg-Asn-Cys-Pro-ArgNH₂

Uma parte da resina de péptidos protegidos do Exemplo 8 foi depois sequencialmente acoplada a 1,5 moles dos amino ácidos Boc adequados e β -(S-4-MeBz1)-Pmp-OH para dar 1,06 g da resina de péptidos protegidos final Pmp(S-4-MeBz1)-D-Tyr(Et)-Phe-Chg-Asn-Cys(S-4-MeBz1)-Pro-Arg-(Tos)-MBHA-resina, obtida após secagem em vácuo.

Esta resina de péptidos protegidos foi tratada com 1,5 ml de anisolo e 25 ml de ácido flucrídrico anidro.

Depois da oxidação usual com ferricianeto de potássio e isolamento numa coluna C₁₈ obtiveram-se 165 mg de produto em bruto do título. Outra purificação por CCD G-15 e filtração gel P-2, como acima se descreveu, deu 55 mg de produto HPLC puro do título.

Teor em péptidos: 88%

FAB/MS: m/z 1119 ($M+H$)⁺

EXEMPLO 10

Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(OH) e o seu uso na preparação do composto do Exemplo 3

Dissolveram-se 4,87 g (15 mmol) de BocCys (4MeBz1) em 30 ml de etanol e juntaram-se 10 ml de água. O pH foi então ajustado até 7,1 com uma solução aquosa de bicarbonato de césio.

Concentrou-se a mistura e evaporou-se o resíduo três vezes com 50 ml de tolueno. O resíduo foi então colocado em alto vácuo à temperatura ambiente durante a noite.

Dissolveu-se o sal em 35 ml de dimetilformamida e juntaram-se 5 g de clorometilfenil-resina comercial. Agitou-se a mistura a 53° em argon durante a noite.

Filtrou-se a mistura e lavou-se a resina com dimetilformamida (5x60 ml), DMF/água (9:1) (5x60 ml) DMF (5x60 ml) e eta-

-25-

nol (6x60 ml). Foi então seco em alto vácuo à temperatura ambiente durante o fim-de-semana.

A cadeia peptídica foi construída num sintetizador Beckman como acima se descreveu usando os derivados Boc de Asn, Val, Phe, D-Tyr(Et) e o derivado S-(4-MeBzl)Pmp. Retirou-se a resina e colocou-se num agitador ("shaker") manual.

Trataram-se 0,86 g da resina peptídica com 1,5 ml de anisolo e agitou-se durante 60 min. a 0º em 15 ml de ácido fluorídrico. O ácido fluorídrico foi então removido sob pressão de aspiração a 0º.

Lavou-se então o resíduo com 3x25 ml de éter (deitado fora) e eluiu-se o péptido com dimetilformamida e 30% de ácido acético (4x10 ml). Juntou-se esta solução a 2 l de água desgasificada e ajustou-se o pH a 7,0 com hidroxido de amónio. Juntou-se lentamente uma solução (35 ml) de ferricianeto de potássio 0,01M.

Ajustou-se então o pH a 4,5 com ácido acético e agitou-se a mistura durante 30 minutos com 25 g (WET) (não secos) de uma resina permutadora de iões (AG-3x4 1R-4S) fracamente básica. Filtrou-se a suspensão e lavou-se a resina com 2x400 ml de ácido acético a 30%.

O filtrado foi depois passado por uma coluna C₁₈ "flash" (7x16 mm). A coluna foi então lavada com água (3x400 ml) e o péptido eluido com acetonitrilo/água/TFA (50:50:0,25). Juntaram-se as frações 30 a 36, concentrou-se e liofilizou-se obtendo-se 25 mg do produto intermédio livre de Cys(OH)-cíclica do título.

Massa espectral por FAB em glicerol: 827 (M+H)⁺, 825 (M-H)⁻.

Fez-se reagir o ácido Cys (20 mg) com um equivalente de Pro-Arg(NH₂)-HCl (preparada a partir do dicloridrato comercial por tratamento com 1 equivalente de trietilamina) na presença de DCC e HBT em dimetilformamida, produzindo o composto do Exemplo 3. De modo semelhante liga-se Pro(OMe) ao ácido Cys, hidroliza-se com hidróxido de sódio fraco obtendo-se o ácido Pro que se faz então reagir com Arg(HCl)-(OMe) para dar o ácido próximo do composto do Exemplo 3 após hidrólise branda do éster. Isola-se este composto, se tal for desejado, sob a forma de sal de potássio. Veja o Exemplo 12 abaixo. Em alternativa usa-se o Pro-Arg(NH₂) directamente na condensação.



A mistura de 4,5 mg de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-OH preparada como acima e de 1 ml de metanol, foi tratada com diazo metano etéreo e foi purificada por HPLC (50% $\text{CH}_3\text{CN}/50\% \text{H}_2\text{O}/0,1\% \text{TFA}$) obtendo-se 4,3 mg do éster metílico (94%), FABMS m/z 841 ($\text{M}+\text{H})^+$, homogéneo pela HPLC e TLC.

EXEMPLO 11

Preparação de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg(NH₂) por condensação terminal

Preparou-se a BocPro-(resina Merrifield) ligando a BocPro à resina Merrifield por meio do método do sal de céssio obtendo-se Boc-Pro- $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -resina que foi usada como material de partida para a síntese. Esta foi realizada no sintetizador de péptidos Beckman 990-B por meio do seguinte protocolo: Dissolvem-se três equivalentes dos amino ácidos nos solventes adequados [os derivados Boc de 4MeBzl-Cys, Val e Phe em cloreto de metíleno; Asn em dimetilformamida; X, por exemplo, D-Tyr (Et) ou BrBz-D-Tyr em 1:1 de cloreto de metíleno/dimetilformamida; e 4MeBzl-Pmp em cloreto de metíleno] e ligam-se usando uma quantidade equimolar de diciclohexilcarbodiimida (DCC) e de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) excepto para a ligação de 4MeBzl Pmp onde se usou 1,0 equivalente de dimetilaminopiridina como catalizador. A extensão da ligação foi determinada por análises qualitativas de ninhydrina e as ligações (acoplamentos) foram repetidas quando necessário. Removeram-se os grupos Boc usando ácido trifluoroacético/cloreto de metíleno (1:1) e, após lavagem, obteve-se a amina livre usando 5% diisopropiletilamina /cloreto de metíleno. Verificou-se a sequência de péptidos usando o método da fase sólida antes da ligação do 4MeBzl-Pmp, e confirmou-se a sua homogeneidade. Depois da ligação final, secou-se a resina obtendo-se 2,24 g de péptido-resina no caso do composto D-Tyr(Et)²-Pro⁷.

Agitou-se 1,1 g (0,5 mmole) da péptido-resina D-Tyr(Et)² com 3 ml de anisolo, durante 50 min. a 0° (banho de gelo), em 25 ml de ácido fluorídrico (HF). Removeu-se depois o HF sob pressão reduzida a 0°. Lavou-se o resíduo com éter etílico (4x20 ml deitar fora) e eluiu-se o péptido com dimetilformamida 3x10 ml, ácido acético a 20%, 3x10 ml, e hidróxido de amónio 0,3N, 3x10 ml.

Juntou-se o filtrado a 2 l de água desgaseificada e ajustou-se o pH a 7,1 com hidróxido de amónio concentrado. Juntou-se



-27-

então,gota a gota, uma solução 0,01M de ferricianeto de potássio, sob agitação, até persistiu uma cor ligeiramente amarela (41 ml). Ajustou-se o pH a 4,7 com ácido acético e guardou-se em refrigeração durante a noite.

Ajustou-se o pH da solução a 7 com amônia e agitou-se durante 15 min. com 30 g de resina permutadora de íões Bio-Rad AG-3x4 (molhada, forma Cl). Filtrou-se então a solução, lentamente, através de 30 g adicionais de resina. Lavou-se a resina com 4x200 ml de ácido acético a 20% e guardou-se o filtrado em refrigeração durante a noite.

Passou-se então o filtrado por uma coluna "flash" (5 cm x 10 cm) de uma embalagem de sílica gel revestida com um silano C₁₈. A coluna foi então lavada com 350 ml de água e o péptido foi eluído com 500 ml de acetonitrilo/água (0,25% ácido trifluoroacético) (1:1) em frações de 20 ml.

As frações 11-17 foram juntas e concentradas. Dissolveu-se o resíduo em ácido acético conc., diluiu-se com água e liofilizou-se obtendo-se 189 mg da D-Tyr(Et)²-prolina-péptido, que foi usado, sem mais purificação, para a síntese dos péptidos de cauda modificada.

Identificação de:

Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro(OH)

Análise de Amino ácidos: Teor de péptidos 55%, Asp, 1,00; Pro, 1,23; Cys, 0,35; Val, 1,04; Tyr(Et) 1,43; Phe, 1,51.

HPLC: Satisfatória.

Pmp-D-Tyr-Phe-Val-Asn-Cys-Pro(OH)

Análise de Amino ácidos: Teor de péptidos 82%; Asp 0,97; Pro 1,10; Cys 0,39; Val 1,05; Tyr 0,99, Phe 0,99

HPLC: satisfatória, 30% CH₃CN/70% 0,05 M KH₂PO₄, 2 ml/min., 5 uC₁₈, K' = 6,14.

Uma mistura de 10 mg de D-Tyr(Et)-Pro(OH)⁷, preparada como acima, e de 1 ml de metanol, foi tratada com diazometano etéreo e depois purificado por HPLC (50% CH₃CN/50% H₂O/0,1% TFA) obtendo-se 7,5 mg do éster metílico (74%), FABMS m/z 938 (M+M⁺), homogêneo pela HPLC e TLC.

A uma solução do D-Tyr(Et)²-prolina-heptapéptido, preparado como acima se descreveu (29,7 mg, 0,0331 mmol) e Arg (NH₂)



(0,0996 mmol) em dimetilformamida (400 μ l) juntaram-se diciclohexilcarbodiimida (10,3 mg; 0,05 mmol) e dimetilaminopiridina (0,05 mmol) e agitou-se a mistura reagente a 0-20° durante 4 horas. A dimetilformamida foi então removida sob vácuo. O resíduo foi tratado como acima no Exemplo 3, com um rendimento de 45%, obtendo-se a desejada D-Tyr(Et)²-Val⁴-amida.

EXEMPLO 12

Síntese e caracterização de Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Arg(NH₂)₂

A peptidil-resina linear Pmp(S-MeBzl)-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys(S-MeBzl)-Pro-D-Arg(Tos)-BHA-resina foi preparada pelo método da fase sólida usando o protocolo padrão acima descrito. Assim, 1,5 g de benzidrilamina correspondente a 1,0 mmol de amina foi sucessivamente ligada aos derivados de amino ácidos Boc, em excesso 3X, usando DCC/HOBt em cloreto de metileno/DMF (1:1). O Pmp(S-MeBzl) foi acoplado com DCC/DMHP. O fim do acoplamento foi verificado pelo ensaio Kaiser ou pelo ensaio quantitativo da ninidrina. Fez-se o reacoplamento quando o ensaio era negativo.

A peptidil-resina protegida foi lavada com porções sucessivas de cloreto de metileno, metanol, acetato de etilo e cloreto de metileno e depois seca ao ar. O péptido foi separado da resina por 15 ml de ácido fluorídrico líquido na presença de 1,0 ml de anisolo a 0° durante uma hora. Após evaporação do ácido fluorídrico e secagem sob vácuo elevado, lavou-se a resina com 3x20 ml de éter e extraíu-se com 2x50 ml de ácido acético a 50%, 50 ml de ácido acético a 10% e 50 ml de água. Os extractos juntos foram diluídos em água até 4 l e o pH foi ajustado a 7,2 com solução a 50% de hidróxido de sódio. A solução foi titulada com solução 0,01 M de $K_3Fe(CN)_6$ até persistir uma cor amarela (30 ml). Ajustou-se o pH a 4,5 com ácido acético glacial e filtrou-se. Aplicou-se o filtrado a uma coluna permutadora de catiões Bio-Rex-70 (forma H^+), lavou-se com água e eluiu-se com 100 ml de tampão de acetato de piridina (30 ml de piridina, 4 ml de ácido acético, 66 ml de água). O eluente foi evaporado à secura. Dissolveu-se o resíduo numa pequena quantidade de ácido acético a 10% e diluiu-se com água até a solução ficar a 1% de ácido acético e liofilizou-se obtendo-se 650 mg do péptido em bruto, do título.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contra-corrente de n-butanol/ácido acético/água (B/A/W) (4:1:5)



-29-

obtendo-se 33 mg do péptido parcialmente purificado. Este foi de novo purificado por filtração gel sobre coluna Sephadex G-15 em ácido acético a 1% obtendo-se 24,5 mg de péptido puro. A análise de amino ácidos (hidrólise em HCl/TFA 2:1, fenol 0,005% durante 1 hora) deu: Asp 1,00, Pro 0,72, Cys 0,62, Val 0,99, Tyr 1,04, Phe 1,04, Arg 0,95, 71% de péptido. HPLC (40% acetonitrilo/60% água/0,1% TFA), um pico, $K' = 5,2$ (45% acetonitrilo/55% água/0,1% TFA) $K' = 3,6$ (gradiente 20% acetonitrilo, 5'; 20-50% acetonitrilo, 20'; 50% acetonitrilo, 5') $K' = 8,7$, 97% puro. TLC: r_f 0,32 (B/A/W 1:1:1); 0,12 (B/A/W 4:1:1); 0,50 (n-butanol/piridina/ácido acético/água, 15:10:3:12).

A peptidil-resina extraída ainda continha péptidos pela análise de amino ácidos, de modo que foi extraída com 3x50 ml de DMF. A DMF foi evaporada à secura e o resíduo foi dissolvido em HOAc a 10%, diluído até ficar a 1% de ácido acético e lyophilizado, obtendo-se 250 mg adicionais de péptido. A espectrometria de massa FAB deste material deu um m/z 1079 que corresponde a $M+H$ para o desejado péptido cíclico.

EXEMPLO 13

Substituindo uma quantidade estequiométrica de Boc-D-Phe por Boc-D-Tyr(Er-Z) na unidade 2 do péptido sintetizado no Exemplo 1 obtém-se Pmp-D-Phe-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂.

Substituindo Boc-D-Val na mesma posição, usando as reações de cisão e oxidação do Exemplo 2, obtém-se Pmp-D-Val-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg.

Substituindo Boc-D-Leu no Exemplo 1 dá Pmp-D-Leu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂.

Substituindo o ácido β -mercaptop- β , β -ciclotetrametilenopropiônico por Pmp no Exemplo 5 dá Tmp-D-Tyr(Et)-Phe-Abu-Cys-Pro-Arg(NH₂). O ácido β -mercaptop- β , β -ciclohexametilenopropiônico dá o derivado Hmp¹.

Substituindo no Exemplo 1 Boc-D-Nle na unidade 2 e D-Arg(Tos) na unidade 8 dá Pmp-D-Nle-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Arg-NH₂.

Substituindo no Exemplo 2 Boc-D-Cha na unidade 2 dá Pmp-D-Cha-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg.

Substituindo no Exemplo 1 o ácido Boc- α -aminofenilbutírico (Pba) na unidade 2 dá Pmp-D-Pba-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂.

Substituindo Boc-Lys(Clz) no Exemplo 3 por Arg protegido dá Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-NH₂.

Outros compostos representativos, preparados de modo semelhante, são:

Pmp-D-Met-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,
 Pmp-D-Tyr(Me)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-D-Lys,
 Pmp-D-Tyr(Et)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,
 Pmp-D-Tyr(i-Pr)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg,
 Pmp-D-Ile-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg,
 Pmp-D-Nva-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂,
 Pmp-D-Abu-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂.

EXEMPLO 14

Composições de Dose Unitária Parentérica

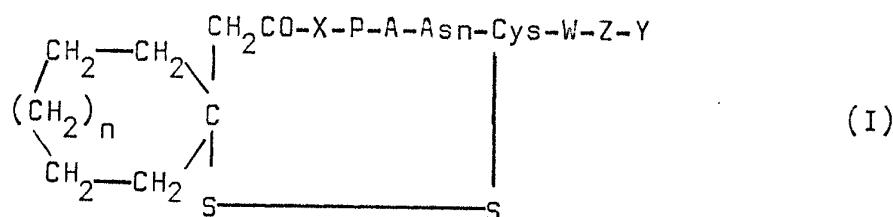
Uma preparação que contém 0,5 mg do octapéptido cílico dos Exemplos 1 ou 3, como pó seco estéril para injeção parentérica, prepara-se do seguinte modo: 0,5 mg de péptido-amida é dissolvido em 1 ml de uma solução aquosa de 20 mg de manitol. Filtra-se a solução, em condições de esterilidade, para uma ampola de 2 ml e liofiliza-se. O pó é reconstituído antes da injeção, quer intramuscular quer endovenosa, ser aplicada a um paciente que sofra de edema susceptível a um mecanismo de acção anti-ADH. Repete-se a injeção, se necessário, de 1 a 5 vezes por dia ou numa injeção contínua i.v.. Preparam-se e usam-se de modo semelhante outros octapéptidos deste invento.

Composições de Dose Unitária Nasal

Suspendem-se 30 mg de octapéptido, finamente moído, deste invento por exemplo o produto do Exemplo 2 numa mistura de 75 mg de álcool benzílico e 1,395 g de um agente de suspensão tal como uma mistura comercial de glicéridos semi-sintéticos de ácidos gordos de alto peso molecular. Coloca-se a suspensão numa bomba de 10 ml de aerosol que é fechada com uma válvula medidora e cheia com propulsores de aerosol. O conteúdo conterá 100 doses unitárias para serem administradas via intranasal a um paciente edematoso, de 1 a 6 vezes por dia.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de um composto de fórmula (I)



-31-

na qual

P é Phe ou Phe(4'-Alq);

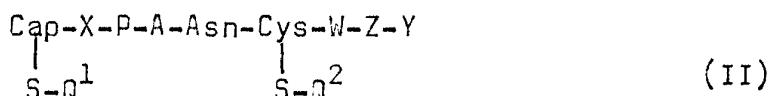
X é D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Nva, D-Pba, D-aIle, D-Nle, D-Cha, D-Abu, D-Met, D-Chg, D-Tyr, L-Tyr, D-Tyr (Et) ou L-Tyr(alq);

Y é NH₂, NHAlq, NHBzl ou OH,

W é D-Pro, L-Pro, dehidro-Pro ou pode ser OH sempre que Y e Z estão ausentes;

A é Val, Ile, Abu, Ala, Gly, Lys, Cha, Nle, Phe, Leu, chg ou Nva;

Z é D-Arg, L-Arg, D-Lys, L-Lys ou pode ser uma ligação simples sempre que Y é OH;

n é 0, 1 ou 2, ou uma prodroga ou sal derivado farmaceuticamente aceitáveis, que compreendem a ciclização de um composto opcionalmente protegido de fórmula (II);

na qual

X, P, A, W, Z e Y são conforme definido acima;

Q¹ e Q² são, cada um, hidrogénio ou um grupo substituível, eCap é um ácido β , β -cicloalquíleno propiónico com S-Q¹ ligado na posição β e tendo 5-7 unidades na cadeia cicloalquíleno e, se necessário, depois, por qualquer ordem,

(a) removendo quaisquer grupos de proteção,

(b) fazendo reagir os citados compostos Cys(OH)⁶ ou Pro(OH)⁷, se estiverem presentes, com um dipeptido, W-Z-Y, ou um amino-ácido, Z-Y, respectivamente, quer na forma protegida por ácido quer na forma amida, ou

(c) formando um sal de prodroga aceitáveis farmaceuticamente.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1 onde Q¹ e Q² são ambos hidrogénio.3 - Processo de acordo com a reivindicação 1 em que Q¹ e Q² são ambos acetamidometilo.

4 - Processo de acordo com as reivindicações 1-3 que compreende ciclização oxidativa.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4 que é conduzido na presença de iodo.

-32-

6 - Processo de acordo com a reivindicação 4 que é conduzido na presença de uma ferricia

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1 na qual um composto $\text{Cys}(\text{OH})^6$ de fórmula I reage com $(\text{NH}_2)_2\text{-W-Z-Y}$ na presença de uma carbodiimida, opcionalmente seguido pela remoção de quaisquer grupos protectores.

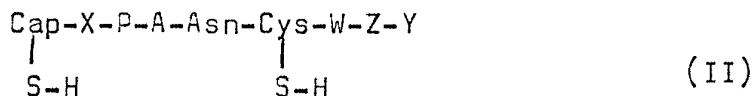
8 - Processo de acordo com a reivindicação 1 no qual um composto $\text{Pro}(\text{OH})^7$ de fórmula I reage com $(\text{NH}_2)_2\text{-Z-Y}$ na presença de uma carbodiimida, opcionalmente seguido pela remoção de quaisquer grupos protectores.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 8 no qual a $\text{Pro}(\text{OH})^7$ reage com $\text{Arg}(\text{NH})_2$ ou um sal seu derivado.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 1 no qual n é 1, X é D-Tyr(Et), P é Phe, A é Val, W é Pro, Z é Arg e Y é NH_2 .

11 - Processo de acordo com a reivindicação 4 no qual n é 1, X é D-Tyr(Et), P é Phe ou Phe(4'-Et), A é Val ou Abu, W é L-Pro ou D-Pro, Z é Arg e Y é NH_2 .

12 - Processo para preparar um composto de fórmula:



na qual:

P é Phe ou Phe(4'-Alq);

X é D-Phe, D-Val, D-Leu, D-Ile, D-Nva, D-Pba, D-aIle, D-Nle, D-Cha, D-Abu, D-Met, D-Chg, D ou L-Tyr ou D ou L-Tyr(alq);

Y é NH_2 , NHAlq, NHBzl ou OH;

W é D-Pro, L-Pro, dehidro-Pro ou, sempre que Y e Z estão ausentes, OH;

A é Val, Ile, Abu, Ala, Gly, Lys, Cha, Nle, Phe, Leu, Chg ou Nva;

Z é D-Arg, L-Arg, D-Lys, L-Lys ou, sempre que Y é OH, uma ligação simples; ou um sal derivado farmaceuticamente aceitável, que compreende a desprotecção de um derivado protegido de um composto de fórmula II.

13 - Processo segundo a reivindicação 12 em que o peptídeo de fórmula II é também separado de uma resina suporte.

14 - Processo segundo as reivindicações 12 ou 13 onde o agente desprotectivo é o ácido fluorídrico,

Lisboa, 13.FEV.1984

-0 Agente Oficial-

Pela SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION