



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 89262 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K007/64 A

A61K037/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.12.20	(73) <i>Titular(es):</i> BEECHAM GROUP, LTD. BEECHAM HOUSE G. W. ROAD BRENTFORD MIDDLESEX TW8 9BD GB
(30) <i>Prioridade:</i> 1987.12.22 GB 8729802	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.12.29	(72) <i>Inventor(es):</i> GORDON WOOTTON GB ERIC ALFRED WATTS GB
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 06/93 1993.06.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTIDEOS CÍCLICOS

(57) *Resumo:*

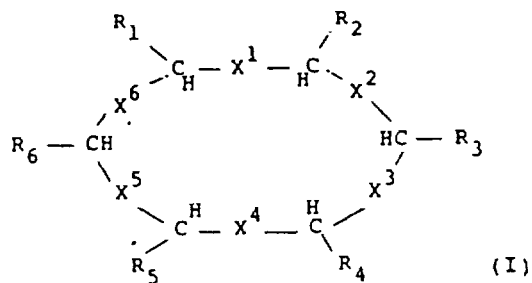
[Fig.]

89.262

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de um peptídeo ciclico farmacológicamente activo de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável:



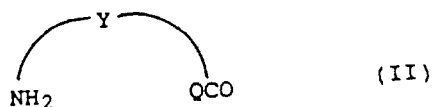
=====

BEECHAM GROUP p.l.c.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS CÍCLICOS"

em que R_1 e R_2 são independentemente $(CH_2)_n NH_2$ ou $(CH_2)_n NH-C=NH.NH_2$ em que n é 3-6; R_3 é C_2R_7 , em que R_7 é fenilo facultativamente substituído com um ou dois substituintes seleccionados de entre halogénio, hidroxí, alquilo C_{1-4} e alcoxi C_{1-4} , ou R_7 é alquilo C_{1-6} ; R_4 , R_5 e R_6 são os mesmos ou diferentes grupos alquilo C_{1-7} ; quatro dos X^1 a X^6 são ligações amida e os outros dois são ligações amida ou ligações em que a ligação amida é substituída por uma ligação estabilizada por enzimas; desde que, quando R_7 for fenilo, pelo menos um dos três átomos de carbono representados na fórmula (I) ligados a R_4 , R_5 e R_6 esteja na configuração L.

O processo para a preparação dos referidos peptídeos consiste em se ciclizar um peptídeo linear de fórmula (II), ou um seu sal;



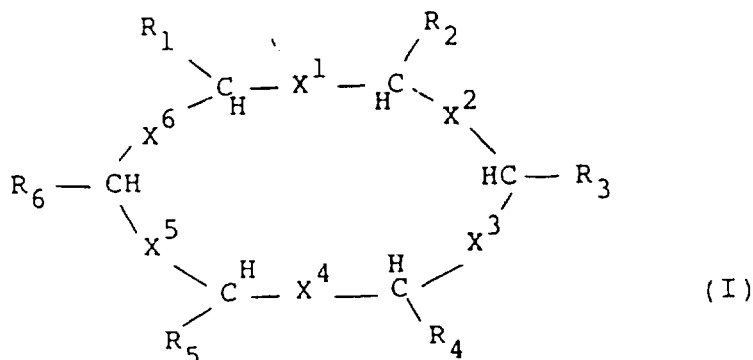
em que Y é uma sequência de amino-ácidos adequada e Q é um grupo separável.

Este invento diz respeito a novos peptídeos cíclicos com actividade farmacológica, a um processo para a sua preparação e aplicação como substâncias de utilidade farmacêutica.

A EP-A-225020 (Beecham Group p.l.c.) descreve um grupo de peptídeos compreendendo, em sequência, unidades seleccionadas de resíduos amino ácido de 17 a 24 de PVI (peptídeo com vasoactividade intestinal) e consistindo, pelo menos, num resíduo de amino-ácidos 18 a 23, ou num análogo seu em que um ou mais dos resíduos de amino-ácidos é substituído por um outro amino-ácido equivalente.

Descobriu-se agora num grupo de novos peptídeos cíclicos baseado nos resíduos de amino-ácidos 18-23 de PVI; estes peptídeos cíclicos com actividade farmacológica na redução da degradação duodenal induzida por ácido/pepsina, são, assim, de pontencial aplicação no tratamento de desarranjos gastro intestinais como a úlcera péptica.

Desta forma, o presente invento disponibiliza um peptídeo cíclico de fórmula (I) farmacologicamente aceitável:



em que

R_1 e R_2 são independentemente $(CH_2)_n NH_2$ ou

ou $(\text{CH}_2)_n\text{NH}-\text{C}=\text{NH}\cdot\text{NH}_2$ em que n é 3-6;

R_3 é C_2H_2R_7 em que R_7 é fenilo substituído com um ou dois substituintes seleccionados de halogénio, hidróxi, alquilo C_{1-4} e alcoxi C_{1-4} , ou R_7 é alquilo C_{1-6} ;

R_4 , R_5 e R_6 são alquilos C_{1-7} do mesmo ou de grupos diferentes; quatro dos X^1 a X^6 são elos de amida ou elos em que a ligação amida é substituída para uma ligação estabilizada por enzimas; desde que, quando R_7 for fenilo, pelo menos um dos três átomos de carbono representados na fórmula (I) ligados a R_4 , R_5 e R_6 esteja na configuração L.

Exemplos adequados de R_4 , R_5 , R_6 e R_7 quando R_7 é alquilo incluem metilo, etilo, n e iso-propilo, n-, iso-, sec-, e ter-butilo.

Exemplos adequados de substituintes para R_7 quando este for fenilo incluem, hidróxi, cloro, bromo, fluoro, metilo, etilo, metoxi e etoxi.

Exemplos adequados para substituições em X^1 a X^6 , de elo de amida para uma enzima estabilizada incluem $-\text{CONCH}_3-$, $-\text{CSNH}-$, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans) e $-\text{CH}_2\text{S}-$. A ligação de amida também pode ser estabilizada por substituição de metilo no átomo de carbono \searrow adjacente, onde for apropriado.

No que se refere à estabilização da enzima dos elos de amida referir-se-à, aqui, a seguinte literatura:

1. A. Spatola em "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins"; B. Weinstein (Ed), Marcel Dekker (New York) 1983, Vol 7 pp 267-358.
2. J. Samanen in 'J. Biochemical Polypeptides'; L.G. Gebelein

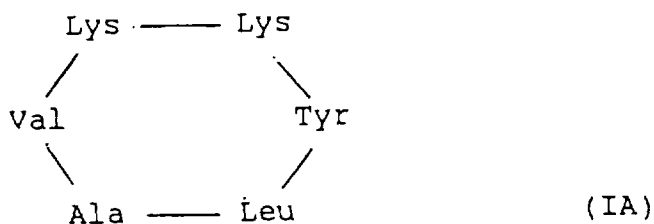
and L.E. Carraher Jr. (Eds), Plenum (New York) 1985 pp 279-382.

3. D. Tourwé in 'Janssen Chim. Acta'; F. Meskens (Ed.) 1985, 3 (1), 3-15 (C.A. 1985, 103, 105267).

4. J.S. Morley in 'Trends in Pharmaceutical Sciences' 1980, p463 (publ. Elsevier).

5. V.J. Hruby in 'Life Sciences' 1982, 31, pp 189-199.

Num aspecto suplementar o presente invento fornece um peptídeo cíclico de fórmula (IA) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável:



em que os resíduos de amino-ácidos estão definidos a seguir e em que um ou mais dos resíduos amino ácido podem ser substituídos por um outro amino ácido equivalente.

Os componentes do amino ácido podem estar na forma D- ou L-.

Quando um ou mais dos resíduos de amino-ácidos foram substituídos por um outro amino ácido equivalente, estes amino-ácidos equivalentes podem ser de ocorrência natural ou não-natural, na forma L- ou na D- ou DL-, sujeitos



às limitações da fórmula (I). Os Lis-Lis-Tir (ou R_1, R_2, R_3 átomos de carbono), estão, preferencialmente na configuração-L. Os Leu, Ala e Val (ou R_4, R_5, R_6 átomos de carbono) estão, preferencialmente, na configuração-D.

As abreviaturas utilizadas para os amino-ácidos são as seguintes:

Amino-ácido	Abreviatura
Alanina	Ala
Leucina	Leu
Lisina	Lis
Norleucina	Nle
Fenilalanina	Fen
Tirosina	Tir
Valina	Val

Os amino-ácidos podem considerar-se como membros de diferentes classes; tais agrupamentos são bem conhecidos. A substituição de um amino ácido de um peptideo por um amino ácido equivalente pode ser feita por outro amino ácido da mesma classe, e onde um amino-ácido se poder incluir em duas ou mais classes, a substituição pode ser feita a partir de uma ou mais dessas classes.

Assim, por exemplo:

-alanina pode ser substituída por outro amino-ácido hidrofóbico, p. ex., norvalina

-valina pode ser substituída por outro amino-ácido hidrofóbico, p.ex., leucina ou isoleucina

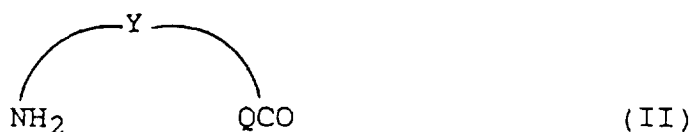
-tirosina pode ser substituída por outro amino-ácido hidrofóbico, especialmente leucina ou outro amino-ácido aromático p.ex., fenilalanina (quando um de Val, Ala, ou Leu estiver na forma L-);

-leucina pode ser substituída por outro amino-ácido hidrofóbico, p.ex., valina ou isoleucina.

Sais de adição de ácidos podem ser, por exemplo, sais com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido ortofosfórico ou ácido sulfúrico, ou ácidos orgânicos como, por exemplo, ácido metanossulfônico, toluenossulfônico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido salicílico, ou acetilsalicílico.

Os compostos de fórmula (I) estão preferencialmente na forma farmacêuticamente aceitável. Por forma farmacêuticamente aceitável significa-se, inter alia, de um nível de pureza farmacêuticamente aceitável excluindo aditivos farmacêuticos habituais, como diluentes e transportadores e sem incluir substâncias consideradas tóxicas a níveis normais de dosagem. Um nível de pureza farmacêuticamente aceitável será pelo menos 50% excluindo aditivos farmacêuticos habituais, de preferência 75% e com mais preferência 90% e ainda com maior preferência 95%.

O invento também fornece um processo para a preparação de um peptídeo cíclico de fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável, processo esse que abrange a ciclização de um peptídeo linear de fórmula (II);



em que y é uma sequência amino-ácido facultativamente protegida

da, correspondendo aos amino-ácidos no peptideo ciclico dese-
jado de fórmula (I); e Q é um grupo destacável; e a partir
daí, removendo, onde necessário, quaisquer grupos protectores
da cadeia lateral de amino ácido e, facultativamente, forman-
do um sal seu farmacêuticamente aceitável.

Q pode ser OH, sendo neste caso, a ci-
clização levada a cabo por processos de condensação conven-
cionais, por exemplo, utilizando um agente desidratante a pH
neutro, num solvente aprótico inerte, como a dimetilformamida
(DMF) ou dimetilacetamida, à temperatura de -40°C a 50°C de
preferência, próximo da temperatura ambiente.

Os exemplos de agentes desidratantes
incluem carbodiimidas, como a diciclo-hexilcarbodi-imida (DCC)
e diisopropilcarbodi-imida (DIC). Agentes alternativos para
a promoção da condensação incluem agentes activantes do ácido
carboxílico como a difenilfosfonil azida (DPPA).

O pH pode ser ajustado utilizando um
ácido ou uma base fraca apropriados como NaHCO_3 , ácido hidro-
clórico diluido, diisopropiletilamina (DIPEA) ou trietilami-
na.

O composto de fórmula (II) pode estar
na forma de um sal, tais como aqueles com ácidos orgânicos
(p.ex., o sal trifluoroacetato) ou o sal Bu_4N^+ .

Outro significado adequado para Q é N_3 ,
que é habitualmente obtido a partir do correspondente compos-
to de fórmula (II) em que Q é substituído por NHNH_2 i.e. a
hidrazida de fórmula (III)





O composto de fórmula (III) é convertido na azida de fórmula (II), correspondente por reacção com ácido nitroso, in situ, seguida para neutralização com uma base inorgânica, como o hidrogenocarbonato de sódio ou com uma base orgânica como a trietilamina ou diisopropiletilamina.

Os reagentes que produzem ácido nitroso incluem nitritos de alquilo como o nitritode t-butilo ou nitrito de isoamilo ou um sal nitrito de metal alcalino, como o nitrito de sódio ou o nitrito de potássio, na presença de um ácido forte como o clorídrico, o sulfúrico ou, se desejado ou necessário o ácido fosfórico. Quando se utiliza um nitrito de alquilo a reacção é levada a cabo em solventes não aquosos ou numa mistura de solventes aquosos/não aquosos quando se utiliza um sal, nitrito de metal alcalino. Os solventes não aquosos, incluem dioxano, clorofórmio, acetato de etilo ou diclorometano. As misturas adequadas de solventes aquosos/não aquosos incluem água com dimetilformamida (DMF), tetra-hidrofurano ou dioxano.

A azida de fórmula (II) torna-se ciclizada, originando o composto de fórmula (I), desejado, sob as seguintes condições.

A selecção dos grupos protectores da cadeia lateral é ditada por numerosos factores, como as condições particulares de ligação, os componentes de amino ácido envolvidos no passo de síntese e a escolha da resina funcionalizada.

Em regra os grupos amino protectores utilizados incluem aqueles que são bem conhecidos para estes fins, por exemplo, substituintes uretano protectores como o benziloxicarboxilo (carbобензоxi), (CBZ=Z), t-butiloxicarbonilo (Boc) e 9-Fluorosnilmetiloxicarbonilo (Fmoc). Prefere-se utilizar o grupo Fmoc para proteger o grupo α -amino nos amino-ácidos sujeitos à reacção no fim carboxílico do re-

ferido amino-ácido. O fim carboxílico é activado pela formação de um anidreto, (a partir do equivalente 2 mole do amino-ácido protegido e DCC ou DIC num solvente como THF ou CH_2Cl_2), ou pela formação de um éster activado como um fenil éster substituído, p.ex., orto- ou para-nitrofenilo ou penta-fluorofenilo. O éster activado pode ser formado in situ por quantidades equimolares de DCC ou DIC e o álcool apropriado.

A cadeia lateral de amino grupo da Lisina pode ser protegida pelo grupo Boc ou CBZ ou 2,6-Cl-CBZ. O OH da tirosina pode ser protegido por um grupo t-butilo (Bu) ou um grupo 2,6-clorobenzilo. A escolha dos grupos protectores defenderá do processo final de desprotecção, por exemplo os grupos Boc e Bu podem ser retirados pelo ácido trifluoroacético. Contudo, pode ser preferível assegurar que não há perda de grupos protectores da cadeia lateral durante a síntese do peptídeo linear e escolheu os grupos CBZ e 2,6-Cl-Bz mais estáveis em ácidos que possam ser removidos por processos hidrogenolíticos.

A desprotecção processa-se convencionalmente. Por exemplo, um tratamento prolongado com ácidos fortes como o ácido trifluoroacético (TFA), o ácido trifluorometano-sulfónico (TFMSA) ou o HF gerarão os sais correspondentes do peptídeo cíclico desejado. Em alternativa pode conseguir-se uma desprotecção mais suave por métodos hidrogenolíticos onde a escolha do sal final pode ser uma função do solvente usado, p.ex., 5% Pd sobre C em etanol; água: ácido acético 8:2:1 darão o sal acetato do produto final.

A purificação do produto pode fazer-se por métodos convencionais como se descreve nos exemplos adiante apresentados.

O peptídeo linear intermédio de fórmula (II) é preparado de acordo com métodos genericamente descritos em PE-A-225020, assunto que aqui está incorporado por referência.

Em regra não é crítica a questão da selecção do amino-ácido para o terminal C desde que a sequência de amino-ácidos seja a sequência desejada para o peptideo ciclicizado requerido.

A selecção do primeiro amino-ácido para iniciar a cadeia não é crítica, uma vez que o peptideo linear será tornado ciclico, mas podem existir outros factores que tornem preferível um amino-ácido inicial, relativamente a outro. Por exemplo a escolha do grupo protector da cadeia lateral pode influenciar a escolha do amino-ácido N terminal, a capacidade para, selectivamente, retirar o N terminal, e a sequência pretendida de amino-ácidos no peptideo ciclico. Outros factores incluem a susceptibilidade dos amino-ácidos à racemização (i.e. prefere-se que o primeiro amino-ácido não seja susceptível), e considerações estéticas que podem afectar a ciclização do composto de fórmula (III).

A síntese do peptideo linear, por fase sólida, é levada a cabo por passos sobre uma resina funcionalizada. A natureza da funcionalização é escolhida de tal forma que o peptideo linear possa ser removido de tal forma que os grupos protectores da cadeia lateral permaneçam intactos e o peptideo linear apenas tenha exposto a metade amino de terminal N e a metade ácido carboxílico terminal C. Considera-se, geralmente, ser de boa prática, embora não seja absolutamente necessário, incorporar um amino-ácido referência entre a funcionalização para que a síntese possa ser controlada a qualquer momento por análise de amino-ácido. Um grupo espaçador adequado pode ser incorporado para facilitar a ligação sintética do amino-ácido referência com a metade "ligadora". É a integridade química desta "ligadora" que permite ao utilizador construir o peptideo linear de um modo, sequencial com um amino-ácido derivatizado adequado que permite (i) ligação do primeiro amino-ácido ao ligante (habitualmente com um elo éster) (ii) retirada selectiva da protecção do terminal N do primeiro amino-ácido para permitir a cons-

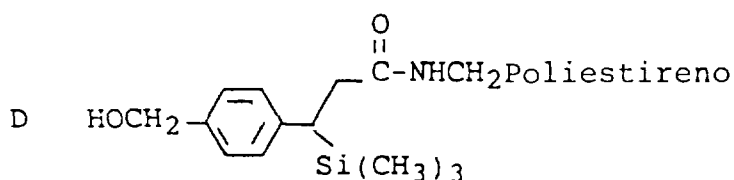
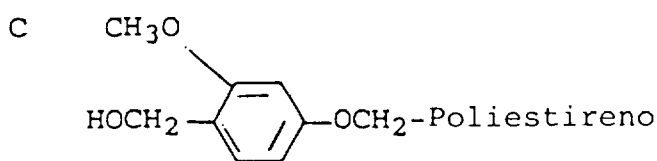
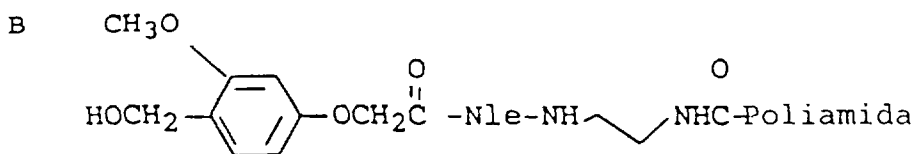
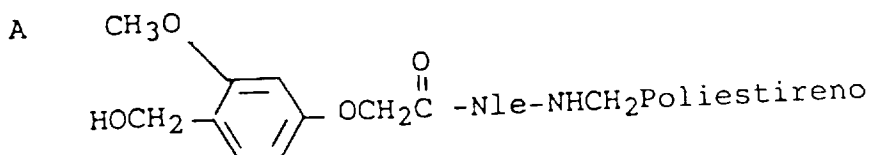
trução sequencial do peptideo linear (iii) separação do peptideo linear para dar o peptideo linear, como o amino terminal N-ácido carboxílico terminal C, com a protecção da cadeia lateral intacta.

A escolha eventual de resina pode ser influenciada pela escolha do grupo funcionalizador, do comprimento do peptideo linear, se a síntese é levada a cabo de um modo manual, automático ou semi-automático. A própria resina pode estar apoiada ou existir na forma de leito livre e pode estar dispersa num solvente predeterminado.

A resina pré-peptídeo pode, assim, tomar a forma que se ilustra a seguir:

Ligador...Amino-ácido referência..Espaçador..Resina

Combinações possíveis são:





A separação de A, B ou C dá-se com ácidos médios, por exemplo, ácido trifluoroacético 1-5% em diclorometano, ou de D com $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ para dar o peptideo linear de fórmula (II) como o sal TFA ou o sal Bu_4N^+ respectivamente.

Os ligadores atrás referidos são conhecidos, por exemplo, os ligadores A, B e C são descritos por R.C. Sheppard e B.J. Williams em Int. J. Peptide Res. 20, 1982, 451-454.

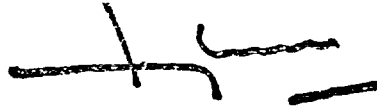
Contudo, em larga escala, prefere-se que o peptideo linear intermédio de fórmula (II), seja preparado por métodos de solução clássica. Quando se requerem intermédios abrangendo ligações amida, estabilizada por enzima, faz-se aqui referência às referências apropriadas 1-5 que anteriormente se listaram.

O presente invento fornece, ainda, em peptideo ciclico do presente invento, num método de tratamento do corpo humano ou animal.

Onde o peptideo ciclico estiver na forma de sal seu, deve, evidentemente, ser entendido que este é um sal fisiologicamente tolerável, que é farmacêuticamente aceitável.

O peptideo ciclico do invento pode ser administrado per se ou, de preferência, como uma composição farmacêutica incluindo também um suporte farmacêuticamente aceitável.

Deste modo, o presente invento fornece, uma composição farmacêutica, que compreende um peptideo ciclico do presente invento, em mistura ou conjunção com um suporte farmacêuticamente aceitável.



A preparação pode, se desejado, estar na forma de uma embalagem acompanhada por instruções de aplicação esentas ou impressas.

De acordo com a prática farmacêutica convencional o suporte consiste num diluente, agente de enchimento, desintegrante, agente molhante, lubrificante, corante, cromatizante ou usa aditivos convencionais.

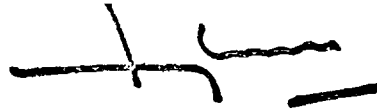
Uma composição farmacêutica do invento encontra-se, de preferência, sob a forma de dose unitária.

A gama de dosagem adequada para compostos do invento pode variar de composto para composto e pode depender da condição de ser tratada. Também defenderá, inter alia, de relação potência/absorbabilidade e da forma de administração escolhida.

As composições são preparadas por mistura e são convenientemente adaptadas à administração oral ou parentérica e como tal podem estar na forma de comprimidos, cápsulas, preparações líquidas para administração oral, pós, grânulos, pastilhas, pós reconstituíveis, soluções ou suspensões injectáveis ou para infusão ou supositórios. As composições administráveis oralmente são preferidas por serem mais adequadas para utilização geral.

Os comprimidos e as cápsulas para administração oral são, habitualmente, apresentados em dose unitária e contêm excipientes convencionais como, ligantes, agentes de enchimento, diluentes, agentes para a formação de comprimidos, lubrificantes, desintegrantes, corantes, aromatizantes e agentes molhantes. Os comprimidos podem ser revestidos de acordo com métodos bem conhecidos na arte, por exemplo com um revestimento entérico.

Agentes de enchimento adequados incluem



celulose, manitol, lactose e outros agentes similares. Desintegrantes adequados incluem amido, polivinilpirrolidona e derivados de amido como o glicolato de amido de sódio. Lubrificantes adequados incluem, por exemplo, o estearato de magnésio.

Agentes molhantes adequados, farmacêuticamente aceitáveis, incluem laurilossulfato de sódio. Preparações líquidas para administração oral podem estar na forma de, por exemplo, suspensões aquosas ou oleosas, soluções, emulsões, xaropes, ou elixires, ou podem ser apresentados como produto seco para reconstituição com água ou outro veículo adequado, antes da utilização. Tais preparações líquidas podem conter aditivos convencionais como agentes promotores de suspensão, por exemplo sorbitol, xarope, metil-celulose, gelatina, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, gel de estearato de alumínio ou gorduras comestíveis hidrogenadas, agentes emulsificantes, por exemplo, lecitina, monooleato de sorbitano, ou acácia; veículos não aquosos (que podem incluir óleos comestíveis), por exemplo, óleo de amêndoas, óleo de coco fraccionado, ésteres oleosos como os ésteres de glicerina, propilenoglicol, ou álcool etílico; conservantes, por exemplo, p-hidrobenzoato de metilo ou propilo ou ácido sórbico, e, se desejado, agentes aromatizantes ou corantes convencionais.

As preparações líquidas para administração oral estão habitualmente na forma de suspensões aquosas ou oleosas, soluções, emulsões, xaropes, ou elixires ou são apresentadas como um produto seco para reconstituição com água ou outro veículo adequado antes da utilização. Tais preparações líquidas podem conter aditivos convencionais como agentes promotores de suspensão; agentes emulsificantes, veículos não aquosos (que podem incluir óleos comestíveis), conservantes, e agentes aromatizantes ou corantes.

As composições para administração oral



podem ser preparadas por métodos convencionais de mistura, enchimento ou compressão. Operações de mistura repetidas podem ser utilizadas para distribuir o agente activo ao longo daquelas composições empregando grandes quantidades de enchedores. Tais operações são, evidentemente, convencionais na arte.

Para administração parentérica, preparam-se formas de dose unitária fluida contendo um composto do presente invento e um veículo estéril. O composto pode ser suspenso ou dissolvido, conforme o tipo de veículo e a concentração. As soluções parentéricas preparam-se normalmente por dissolução do composto no veículo e esterilizando um frasco ou ampola adequados e de selar.

Adjuvantes como um anestésico local, conservantes e agentes tampão também são, com vantagem, dissolvidos no veículo. Para aumentar a estabilidade, a composição pode ser congelada após o enchimento do frasco e a água retirada sob vácuo.

As preparações parentéricas são preparadas de uma forma substancialmente igual com excepção do facto de composto ser suspenso no veículo em vez de ser dissolvido e esterilizado por exposição de óxido de etileno antes de ser suspenso no veículo estéril. É incluído, com vantagem, na composição um surfactante ou agente molhante para facilitar a distribuição uniforme do composto do invento.

O presente invento também disponibiliza um método de tratamento de mamíferos, incluindo o homem, que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade efectiva, não tóxica, de um peptideo ciclico do presente invento; e um peptideo ou análogo do presente invento para aplicação farmacêutica, particularmente para utilização no tratamento da úlcera peptica.



O ingrediente activo pode ser administrado, convenientemente, como uma composição farmacêutica anteriormente definida, e isto constitui um aspecto particular do presente invento.

Uma dose adequada está, por exemplo, no intervalo de 0,01 a 100 com mais frequência 0,01 a 10, preferencialmente 0,01 a 2,5 mg/kg. Uma dose diária possível para o homem é, por exemplo, 1,0 a 50 mg por infusão intravenosa, 1,0 a 250 mg por aerosol ou 1,0 a 500 mg por administração oral, incluindo a forma de cápsula revestida entérica.

Não são indicados efeitos toxicológicos adversos para as doses anteriormente mencionadas.

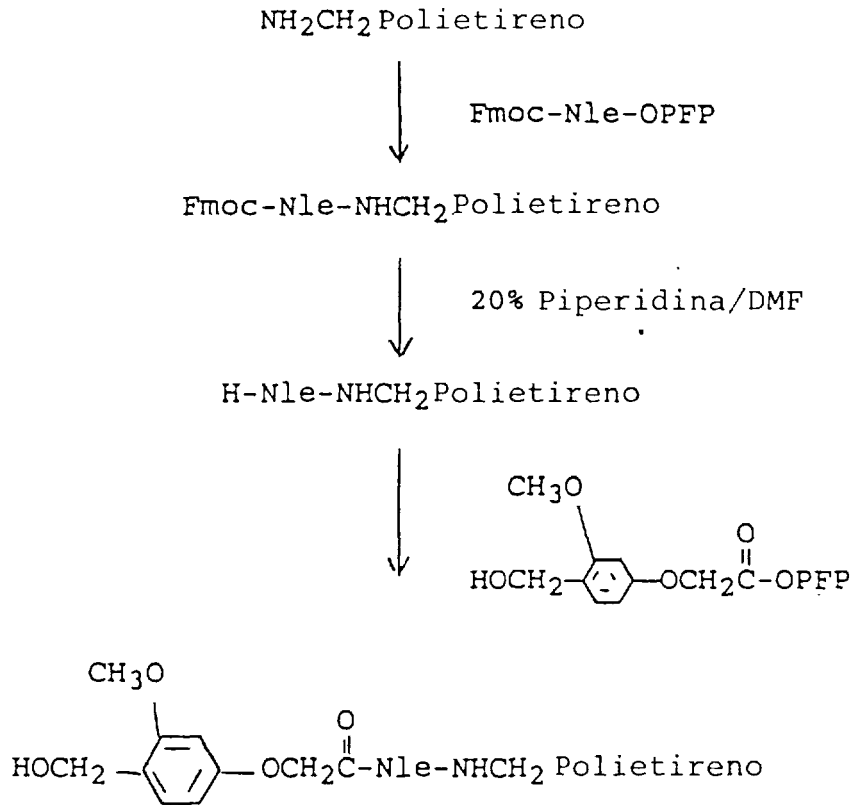
Os exemplos seguintes ilustram o invento; as descrições seguintes ilustram a preparação das resinas funcionalizadas.

Cada exemplo de peptídeo cíclico foi caracterizado por clivagem acidolítica de 24 h e análise de amino-ácidos derivatizados com FITC (fenilisotiocianato) (Waters Picotag System) e espectrometria de massa por bombardeamento atômico rápido (BAR) (Jeol D x 303).

Na parte que se segue os vários grupos protectores, reagentes e solventes são referidos por abreviações, por conveniência.

<u>Abreviaturas</u>	Grupo/reagente etc.
Boc	t-butiloxicarbonilo
Bu	t-butilo
CBZ ou Z	Benziloxicarbonilo
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
HOBT	Hidroxibenzotriazole
OPFP	Éster pentafluorofenilo
ONP	Éster para-nitrofenilo
DCC	Diciclo-hexilcarbodi-imida
DIC	Di-isopropilcarbodi-imida
DPPA	Difenilfosfonil-azida
TFA	Ácido trifluoroacético
DMAP	Dimetilaminopiridina
DIPEA	Diisopropiletilamina
TFMSA	Ácido trifluorometanossulfónico
DCU	Diciclo-hexilurea
DMF	Dimetilformamida
THF	Tetra-hidrofurano
DMA	Dimetilacetamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

Preparação da Resina Funcionalizada A



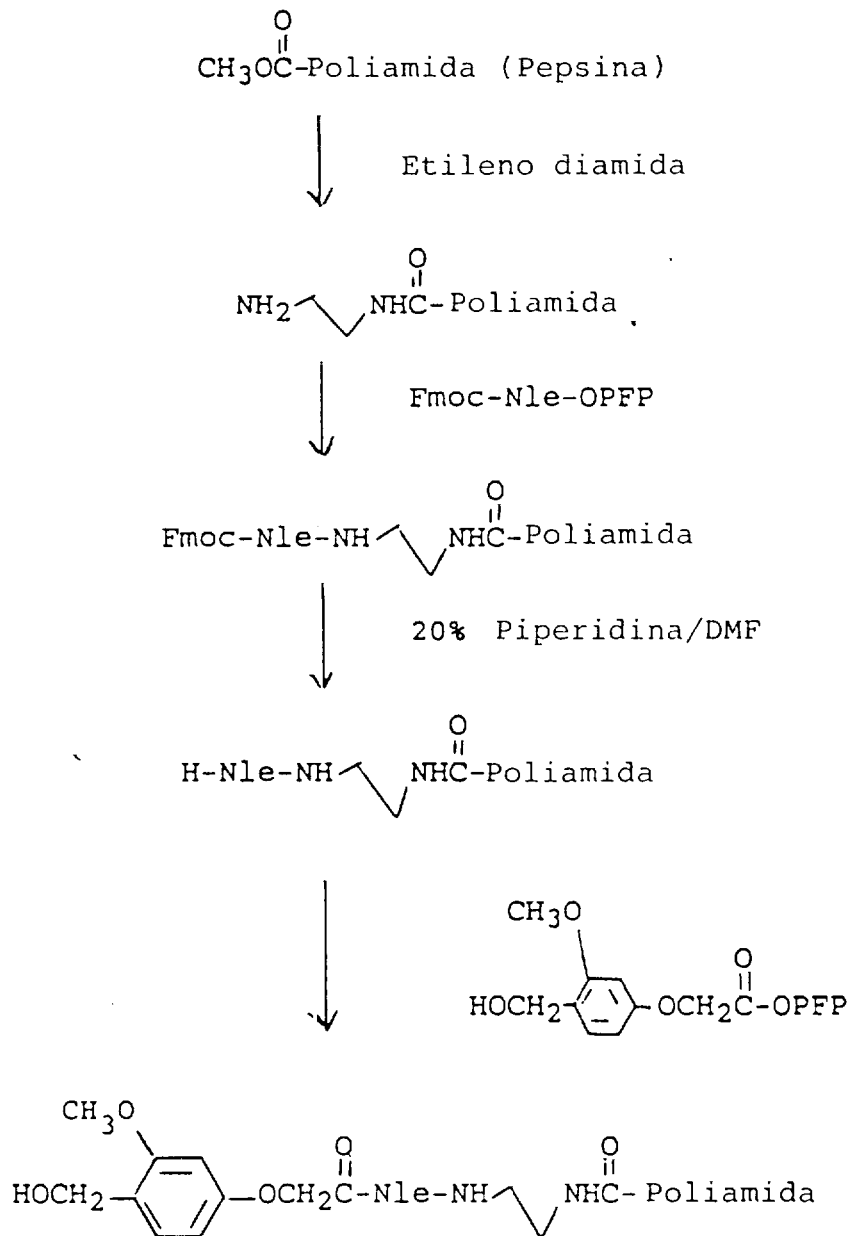
Espandiu-se aminoetilpoliestireno (Bachem UK (td) (lg, 0,5 mequiv/g) por agitação sob o efeito de um jacto contínuo de bolhas de azoto em DMF/CH₂Cl₂ (20 ml) durante 2x15 minutos. Adicionaram-se à resina drenada Fmoc-Nle-OPFP (649 mg, 2,5 equivs) e HOBT (169 mg) em DMF/CH₂Cl₂ a 10% (10-15 ml) e o conjunto foi agitado durante 1 hora. A reacção foi controlada até ao final pelo teste de ninidrina (Kaiser, E. et al. Anal. Biochem (1970) 34, 595). A resina



foi drenada e lavada repetidamente sob agitação similar, com DMF (10x15 mlx1 min). Foi adicionada piperidina 20% em DMF (15 ml) à resina drenada e a mistura agitada como se referiu atrás durante 3 minutos e então de novo durante 7 minutos com uma lavagem intermédia com DMF (2x15 mlx1 min). A resina foi então sujeita a uma lavagem suplementar com agitação com DMF (10x15 mlx1 min). Adicionaram-se à resina drenada 4-hidroxi-metil-3-metoxifenoxi-acetato de (567 mg, 3 equivs) e HOBT (202 mg, 3 equivs) em DMF (10-15 ml) e agitou-se o conjunto, como anteriormente, durante 1 hora. Uma lavagem com DMF (10x15 mlx1 min) deu a resina expandida, pronta para aplicação imediata na preparação dos ácidos terminal-C do peptideo linear a protecção da cadeia lateral intacta.

Esta resina funcionalizada pode, em alternativa, ser lavada sucessivamente com CH_2Cl_2 (10x15mlx1 min) e Et_2O anidro (10x15 mlx1 min), drenada, seca em vácuo e armazenada para utilização mais tarde.

Preparação da Resina Funcionalizada B



Expandiu-se pepsina seca (Cambridge Research Biochemicals Ltd) (1,0 g, 0,3 mequiv.) por agitação durante a noite sob um jacto contínuo de bolhas de azoto em etilenodiamida (35-40 ml). A resina foi drenada e repetidamente lavada sob agitação semelhante com DMF (10×20 ml×1 min.), DIPEA 10% em DMF (2×20 ml×1 min.) e DMF (5×20 ml×1 min.). Foram adicionados à resina drenada Fmoc-Nle-OPFP (935 mg, 6 equivs) e HOBT (243 mg) em DMF (15-20 ml) e o todo agitado durante 1 hora. A reacção foi controlada até final pelo teste Kaiser-ninidrina. A resina foi drenada e lavada repetidamente sob agitação similar com DMF (10×20 ml×1 min.). Foi adicionada piperidina 10% em DMF (20 ml) à resina drenada e procedeu-se a uma agitação como anteriormente durante 3 minutos, e, então novamente, durante 7 minutos com uma lavagem intermédia (2×200 ml×1 min.) com DMF. A resina foi então sujeita a uma lavagem suplementar, com agitação, com DMF (10×20 ml×1 min.).

Foi adicionado acetato de pentafluorofenil 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi (681 mg, 6 equivs) e HOBT (243 mg) em DMF (20 ml) à resina drenada e o conjunto foi agitado como anteriormente durante 1 hora. A reacção foi controlada como anteriormente com o teste Kaiser.

Uma lavagem com DMF (10×20 ml×1 min) deu a resina expandida adequada à preparação imediata do ácido terminal-C do peptideo, com a protecção da cadeia lateral intacta.

Esta resina funcionalizada pode, em alternativa ser, ser sucessivamente lavada com CH₂Cl₂ (10×20ml×1 min), Et₂O anidro (10×20 ml×1 min) drenada, seca em vácuo e armazenada para ulterior utilização.

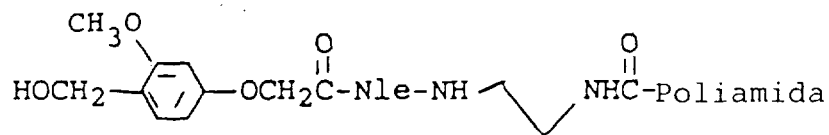
⌊ Esta preparação difere da sugerida por Cambridge Research Biochemicals no facto de utilizar HOBT para aumentar a velocidade de acilação pelos ésteres de penta-

[Handwritten signature]

fluorofenilo₇.

Exemplo 1

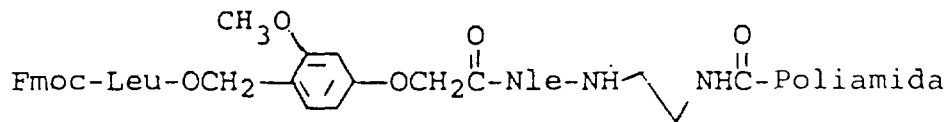
Ciclo-[-D-alcanil-L-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Tirosil-L-Leucina₇



Repetido
uma vez



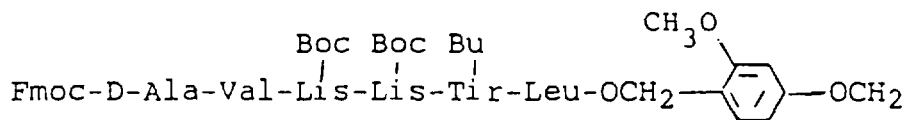
- 1) (Fmoc-Leu)₂O, DMAP
- 2) DMF



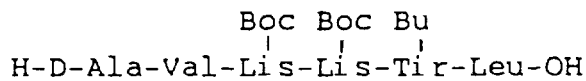
Procedimento
repetido
para cada
Amino ácido



- 1) Piperidina 20%/CMF
- 2) Lavagem com DMF
- 3) Fmoc-Amino Acido-OPFP
HOBT

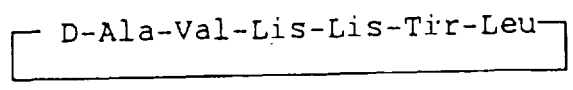


- 1) Piperidina 20%
- 2) Lavagem com DMF
- 3) Lavagem com CH₂Cl₂
- 4) 1% TFA/CH₂Cl₂

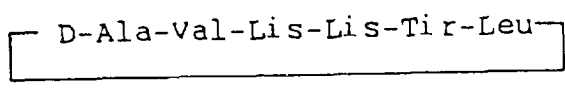


- ↓
- 1) DPPA, DMF, NaHCO₃,
N₂ O^o - 3 dias a tempo ambiente
 - 2) Resina de permuta iónica em leito misto

Boc Boc Bu



- ↓
- 1) TFA 100%
 - 2) HPLC



(E1)

A resina funcionalizada B (1 g, 0,5 meq/g) foi preparada como se delineou acima ou expandida do estado seco em DMF (2x200 mlx15 min.).

Dissolveu-se Fmoc-Leu-OH (530 mg, 5 equiv) em CH₂Cl₂ (4 ml) com DMF (0,5 ml), arrefeceu-se até 0^oC e tratou-se com DIC (96 mg, 0,12 ml). Deixou-se que a mistura agitada atingisse a temperatura ambiente durante 20-25 min. e evaporou-se em vácuo. O resíduo foi dissolvido em DMF (5-10 ml) e adicionado à resina, seguido de DMAP (9 mg). A resina foi agitada sob um jacto contínuo de azoto durante 1 h, drenada, lavada com DMF (5x20 ml x 1 min). Esta adição do primeiro amino ácido foi repetida e a resina drenada e lavada com DMF (10 x 20 ml x 1 min).

Foi adicionada à resina drenada piperidina 20% em DMF e a mistura agitada como anteriormente duran-

te 3 minutos e depois novamente durante 7 minutos com uma lavagem intermédia com DMF (2x15 mlx1 min.). A resina foi então sujeita a um ciclo de lavagem suplementar com DMF (10x15 mlx1 min) para dar a resina com o primeiro aminoácido de terminal-N desprotegido (Leu) ligado.

Os amino ácidos a seguir listados foram então adicionados à resina por passos com desprotecção por piperidina, como se descreveu atrás, após cada ligação.

Em cada caso foi adicionado HOBT (122 mg) e cada ligação deixada durante 60 minutos. O fim da reacção foi controlado pelo teste Kaiser-ninidrina.

Bu Fmoc-Tir-OPFP	563 mg
Boc Fmoc-Lis-OPFP	571 mg
Boc Fmoc-Lis-OPFP	571 mg
Fmoc-Val-OPFP	455 mg
Fmoc-D-Ala-OPFP	430 mg

Quando o último amino-ácido foi adicionado o terminal-N foi desprotegido como anteriormente, drenado, lavado com DMF (10x15 mlx1 min.), CH₂Cl₂ (10x15 mlx1 min.) e Et₂O (10x15 mlx1 min.) e seco em vácuo durante 2 horas.

A resina tornou a ser expandida em CH₂Cl₂ (2x15 mlx1 min.) drenada e tratada com TFA 1% em CH₂Cl₂ (10x20 mlx5 mins.). As soluções resultantes deste tratamento foram evaporadas no vácuo e o resíduo tratado com éter para dar o ácido amino-peptideo de cadeia lateral protegida, impu-

ro, (153 mg) FABM+1=977 utilizado sem purificação suplementar.

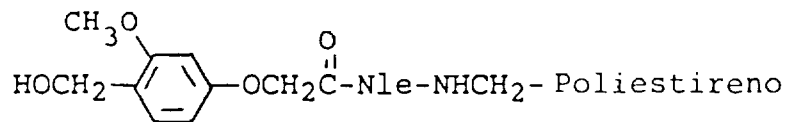
Esta substância (153 mg) foi dissolvida em DMF desgaseificado (200 ml) e arrefecido a 0°C. A solução foi tratada com DPPA (42 ul) e NaHCO₃ sólido (59 mg) e deixada com agitação sob azoto durante 3 dias, atingindo a temperatura ambiente nas primeiras 6 horas. Foram adicionadas à mistura e agitadas durante 3 horas, água (5 ml) e resina de permuta iónica em leito misto Bio-Rad AG 501-X8 (3 g). A mistura foi filtrada e as substâncias insolúveis lavadas com DMF (10-20 ml). O filtrado foi evaporado em vácuo e o resíduo tratado com éter para produzir o peptideo ciclico de cadeia lateral protegida, impuro, (54 mg) FABM+Na⁺=982.

Deixou-se, com agitação durante 4 horas, sob azoto, uma solução desta substância (54 mg) em TFA (10 ml) a 0°C atingindo a temperatura ambiente durante 1/2 hora. A solução foi evaporada num vácuo, tornada azeotrópica com tolueno (ca. 10 ml), depois éter (2x20 ml) para produzir um sólido gomoso. Este sólido foi dissolvido em água e liofilizado, transformando-se num sólido bronco (52 mg). Espectrometria de massa FAB revelou a presença de peptideo ciclico requerido, M+1=703 e de peptideo não ciclisado M+1=721.

Esta mistura foi sujeita a repetidas HPLC sobre coluna de fase reversa uBondapak C18 utilizando 20% MeOH: 80% H₂O contendo 0,1% TFA como eluente para produzir o composto em titulo (10 mg) sob a forma de sal trifluoroacetato. FAB M+1=703.

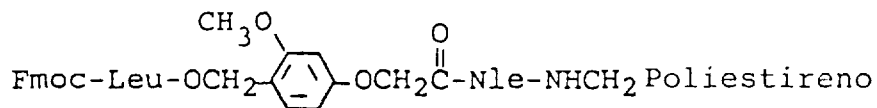
Exemplo 2

Ciclo-[D-Alanil-D-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Tirosil-D-Leucina]



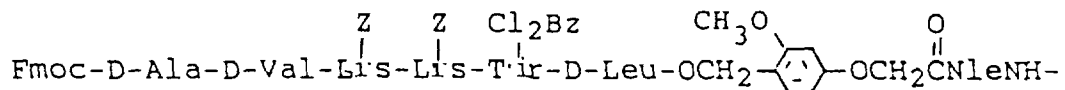
Repetido
uma vez

- 1) (Fmoc-Leu)₂O, DMAP
- 2) DMF

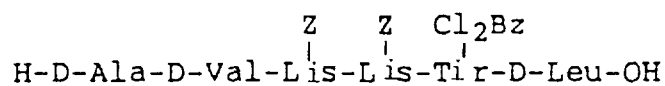


Procedimento
repetido
para cada
Amino ácido

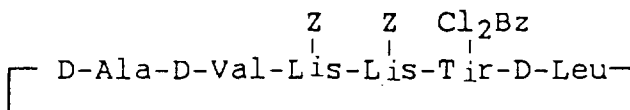
- 1) Piperidina 20%/DMF
- 2) Lavagem com DMF
- 3) Lavagem com DMF
- 4) Fmoc-Amino Ácido-OPFP



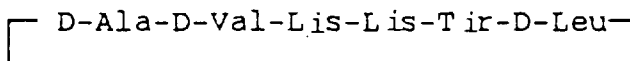
- 1) Piperidina 20%
- 2) Lavagem com DMF
- 3) Lavagem com CH₂Cl₂
- 4) 1-5% TFA/CH₂Cl₂



- 1) DPPA, DMF, NaHCO₃
N₂ 0° → 3 dias a tempo ambiente
- 2) Resina de permuta iónica em leito misto



- 1) 10% Pd/C
EtOH: HOAc: H₂O (7:2:1)



(E2)

A resina funcioanlisada A (1 g, 0,5 meq/g) foi preparada como se delineou anteriormente ou expandida do estado seco em DMF (2x20 mlx15 min.).

Como se delineou anteriormente, foram adicionados à resina, repetindo o ciclo de ligação e desprotecção, os seguintes amino-ácidos.


(Fmoc-D-Leu)₂O (como Fmoc-Leu_{OH} (882 mg; 5 equiv)
DIC (0,2 ml) DMAP (15 mg)

Fmoc-Tir (Cl ₂ Bz)-OPFP	(909 mg; 2,5 equiv)
Fmoc-Lis-(CBZ)-OPFP	(835 mg; 2,5 equiv)
Fmoc-Lis-(CBZ)-OPFP	(835 mg; 2,5 equiv)
Fmoc-D-Val-OPFP	(632 mg; 2,5 equiv)
Fmoc-D-Ala-OPFP	(597 mg; 2,5 equiv)

Após a última desprotecção a matriz resina-peptideo foi seca durante, pelo menos, 2 horas, então expandida em CH₂Cl₂ e tratada com TFA 1%-5% como se expôs no Exemplo 1, para produzir o hexapeptideo linear com a cadeia lateral protegida (523 mg; 92%) FAB M+1=1147 Análise de amino-ácido encontrou Ala=1,0; Val=0,9; Lis=1,9; Tir=1,1; Leu=1,0.

O hexapeptideo ciclico de cadeia lateral protegida (160 mg, 0,14 mmole) foi dissolvido em DMF anidro (30 ml) e hidrogenado sobre Pd/C 10% (160 mg) durante 3 horas à temperatura ambiente. O catalisador foi removido por filtração através de terra de diatomáceas e filtrado evaporado in vacuo. O resíduo foi retirado para uma solução aquosa de ácido acético (200 ml) 5%, filtrado e liofilizado para produzir o composto em título (114 mg; 98%) FAB M+1=703, sob a forma de sal acetato.

Foi conseguida uma purificação adicional por cromatografia de permuta iónica sobre CM TriSacryl* seguida por ensaio HPLC (uBondapak via 30% MeOH: 50 mM NH₄OAC aq:



0,05% HOAc).

*-Marca registada

Os exemplos seguintes foram preparados de uma forma similar.

Exemplo 3

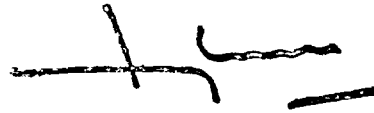
Acetato de Ciclo-/⁻D-Alanil-L-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Fenil-
alanil-L-Leucina₇

FAB M+1=687.

Exemplo 4

Acetato de Ciclo-/⁻D-Alanil-D-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Leucil-
-D-Leucina₇

FAB M+1=653.



Dados Farmacológicos

Método para o problema duodenal induzido por Acido/pepsina

Preparação

Ratazanas macho Wistar, com 180 a 300 g de peso do corpo, foram anestesiados com uretano (1,75 g/kg i.m.). A traqueia é canulada para assegurar uma fácil passagem de ar e a veia jugular é canulada. É levada a cabo uma laporotomia e é inserido um fistular de titânio (3 cm x 0,5 cm d.i.) na parte dianteira não-glandular do estômago. Este chega ao exterior através de um golpe feito no corpo. A cânula de perfusão duodenal é construída a partir de um tubo de doseamento oral 8 fg. Esta cânula tem dois orifícios situados a 1 cm de distância em lados opostos da cânula aproximadamente a 5 cm da extremidade próxima da cânula. O lúmen é fechado entre os dois orifícios e os colares de localização posicionados próximos do orifício superior e afastados do orifício interno.

Esta cânula é passada pela abertura gástrica através do piloro para o interior da fonte mais próxima do duodeno e deixa o duodeno por uma pequena incisão exactamente junto à Papilla de Vater. A cânula é colocada de modo que o orifício mais próximo esteja dirigido para a maior curvatura do duodeno e mantida no lugar em volta dos colares de colocação de forma que produza uma câmara duodenal próxima, excluindo as secreções gástricas, biliares e pancreáticas.

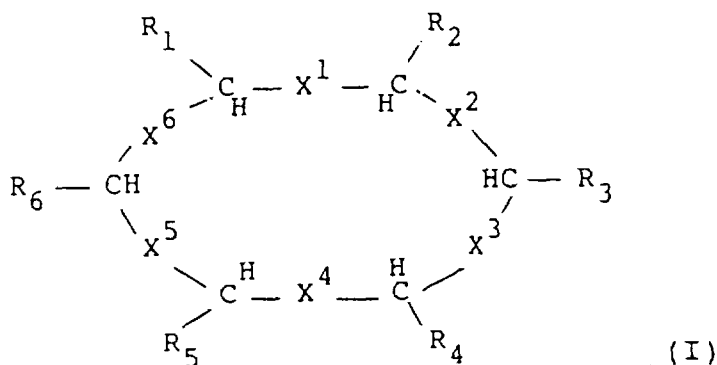
Procedimento Experimental

Após a preparação é aspergido através da câmara duodenal NaCl 0,9% a pH 6,5 a 0,1 ml/min durante 0,5 h, sendo, a partir desta altura, o meio para a aspersão mudado para NaCl 0,9% contendo 30 mM HCl e 250 meg/ml de pepsina (Bovina), que é aspergida com o mesmo débito durante 4,5 h. Os animais são mortos, os duodenos removidos, abertos em NaCl 0,9% e examinados para detectar danos, com um microscópio de baixo poder, por um observador desconhecendo o regime de doseamento e utilizando um sistema de registo de 0 a 10, subjectivo. É utilizado um grupo de dimensão 6 e a significância é determinada, com aplicação do teste 'U' Mann-Whitney. Os compostos são administrados numa solução salina estéril de pH 6,5 sob a forma de infusão i.v. através da veia jugular a um débito de 1,2 ml/h ao longo da experiência, desde o início da aspersão duodenal com pH 6,5.

Com a utilização deste protocolo o Composto E1 com uma dosagem de 450 mmol/kg/h deu uma redução de 51% nos estragos duodenais e o Composto E2 com uma dosagem de 50 mmol/kg/h deu uma redução de 45% nos estragos duodenais ($p < 0,01 > 0,001$).

REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a preparação de um peptideo ciclico farmacológicamente activo de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável:



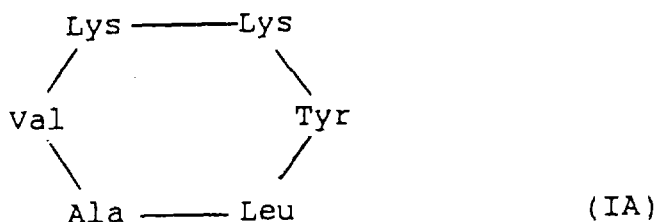
em que R_1 e R_2 são independentemente $(CH_2)_n NH_2$ ou $(CH_2)_n NH-C=NH.NH_2$ em que n é 3-6; R_3 é $CH_2 R_7$ em que R_7 é fenilo facultativamente substituído por um ou dois substituintes seleccionados de entre halogénio, hidróxi, alquilo C_{1-4} e alcoxi C_{1-4} , ou R_7 é alquilo C_{1-6} ; R_4 , R_5 e R_6 são os mesmos ou diferentes grupos alquilo C_{1-7} ; quatro dos X^1 a X^6 são ligações amida e os outros dois são ligações amida ou ligações em que a ligação amida é substituída por uma ligação estabilizada por enzimas; desde que, quando R_7 fôr fenilo, pelo menos um dos três átomos de carbono representados na fórmula (I) ligados a R_4 , R_5 e R_6 , esteja na configuração L; caracterizado por compreender a ciclização de um peptideo linear de fórmula (II)



(II)

em que Y é uma sequência de amino-ácidos facultativamente protegida correspondente aos amino-ácidos no peptideo ciclico desejado de fórmula (I); e Q é um grupo separável; e, em seguida, quando for necessário, a remoção de qualquer grupos protectores das cadeias laterais dos amino-ácidos e a formação, facultativamente de um seu sal farmacêuticamente aceitável.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um peptideo ciclico de acordo com a reivindicação 1 de fórmula (IA) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável;



em que um ou mais dos amino-ácidos pode ser substituído por outro amino-ácido equivalente.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um peptideo ciclico de fórmula (IA) em que Tyr é substituído por outro amino ácido hidrofóbico, como a leucina ou a fenilalanina (quando um dos Val, Ala, ou Leu estiver na forma L).

4a. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 caracterizado por se preparar um peptideo cíclico em que Lys-Lys-Tyr (ou os átomos de carbono de R₁ , R₂ , R₃ estão na configuração L e os Leu-Ala-Val (ou

os átomos de carbono de R₄, R₅, R₆) estão na configuração D.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar ciclo-/[D-Alanil-L-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Tirosil-L-Leucina]₇,

ciclo-/[D-Alanil-D-Valil-L-Lisil-L-Lisil-Tirosil-D-Leucina]₇,

ciclo-/[D-Alanil-L-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Fenilalanil-L-Leucina]₇;

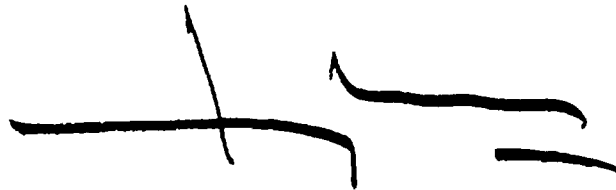
ciclo-/[D-Alanil-D-Valil-L-Lisil-L-Lisil-L-Leucil-D-Leucina]₇,
ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer dos precedentes.

6a. - Processo para a preparação de um medicamento para uso no tratamento de úlceras pépticas, caracterizado por se incluir, no referido medicamento um peptídeo cíclico obtido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7a. - Método para o tratamento de úlceras pépticas caracterizado por compreender a administração de uma quantidade eficaz anti-úlceras de um peptídeo cíclico

obtido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, sendo a gama de dosagem de composto activo de 0,01 a 100 mg, de preferência de 0,01 a 10 mg por kg de peso corporal por dia.

Lisboa, 20 de Dezembro de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA