MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 84 969

NOME: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal da Alemanha.

EPÍGRAFE: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ESTERES DE 4-OXO--3,4-DI-HIDRO-1,2,3-BENZOTRIAZINA-3-ILOXI, DE ÁCIDOS AMINADOS E DE PEPTIDEOS POR UTILIZAÇÃO DESSES ESTERES.

INVENTORES: Dr. Wolfgang Köning, DR.Jochen Knolle e Dr. Gerhard Breipohl

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
República Federal da Alemanha em 30 de Maio de 1986, sob o nº P 36 18 218.4.

Memória descritiva referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemã (inventores: Dr. Wolfgang König, Dr. Jochen Knolle e Dr. Gerhard Breipohl, residentes na República Federal Alemã) para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ESTERES DE 4-OXO-3,4-DI-HIDRO-1,2,3-BENZOTRIAZINA-3-ILOXI, DE ÁCIDOS AMINADOS E DE PEPTIDEOS POR UTILIZAÇÃO DESSES ESTERES"

Memória descritiva

Para a síntese de peptídeos, quer se utilize o método clássico em solução quer, especialmente, se siga o método em fase sólida (B.Merrifield, Adv. Enzymol. 32 /19697 221 - 296) é oportuno utilizar para a reacção de acoplamento uma espécie activa, como seja um anidrido simétrico ou um éster activo, de preferencia a efectuar-se uma activação in situ por um reagente de activação, como por exemplo uma carbodiimida. Deste modo evita-se, especialmente, na síntese em fase sólida, o contacto do grupo amina do ácido aminado ligado à resina de suporte com o reagente de activação. A utilização de anidridos simétricos apresenta no entanto o inconveniente de não serem em muitos casos isoláveis e de se ter de utilizar para os outros desde o inicio uma quantidade dupla do derivado de ácido aminado. A utilização de esteres de N-hidroxisuccinimida, de triclorofe-

nilo e de nitrofenilo já é conhecida desde há muito.

Os ésteres de hidroxisuccinimida não são suficientemente reactivos para a síntese em fase sólida, resultando ciclos de reacção demasiadamente demorados, os ésteres de triclorofenilo são pouco convenientes por causa do problema da dioxina e os ésteres de nitrofenilo são particularmente dificeis de isolar e podem provocar racemizações.

Mais recentemente passaram a usar-se mais frequentemente os ésteres de pentafluorofenilo, que são porém dificeis de purificar. Para a utilização em síntese em fase sólida é, além disso, indispensável a adição de HOBt para se conseguir uma reacção rápida.

Descobriram-se agora novos ésteres de HOObt que são extraordinariamente adequados à síntese de peptídeos por acoplamento de fragmentos especialmente pelo método em fase sólida.

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de derivados de ácidos aminados da fórmula

X - A - OObt

na qual

X significa um grupo protector de uretano,
A significa Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Cys (tBu), Cys (Acm), Met, Pro, Lys (Boc), Asp (OtBu), Glu (OtBu), Phe, Tyr (tBu) Trp, Lys (Z), Lys (Bzl) ou
Cys (4-MeOBzl), podendo qualquer destes ácidos aminados ou derivados apresentar-se sob a forma de L ou D,
e
OObt significa 4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3-benzotriazina-3-iloxi.

Considera-se preferida a preparação destes ésteres sob a forma pura.

Os novos ésteres de HOObt aqui descritos oferecem a vantagem de se poderem obter com alta pureza e de apresentarem boa estabilidade na conservação. A HOObt libertada durante a reacção pode servir de indicador do avanço da reacção em virtude de ser corada. Além disso, os novos ésteres obtidos de acordo com o processo da presente invenção são muito solúveis nos solventes habitualmente usados na síntese em fase sólida (dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) e N-metilpirrolidona (NMP) ao contrário dos ácidos aminados Fmoc livres, o que favorece a sua utilização na síntese automática de peptídeos.

Consideram-se apropriados os grupos protectores de uretano descritos na publicação Hubbuch, Kontakte Merck 1979 No. 3, pag. 11 ff. Consideram-se preferidos os grupos Fmoc e Boc e especialmente preferido o grupo Fmoc.

O processo da presente invenção para a preparação de compostos da fórmula X - A - OObt caracteriza-se por se fazer reagir um composto da fórmula X - A - OH, na qual X e A possuem os significados anteriormente definidos, com 3-hidroxi--4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3-benzotriazina (HOObt) na presença de uma carbodiimida. A reacção pode ser realizada num solvente inerte, como THF, DMF, clorofórmio, diclorometano, acetonitrilo ou misturas destes; preferem-se como solventes os ésteres, como o THF. A reacção pode ser efectuada a uma temperatura entre -20 e +50°C, de preferencia entre -10°C e uma temperatura próxima da temperatura ambiente.

Considera-se ainda abrangido no âmbito da presente invenção um processo para a preparação de peptídeos por acoplamento de fragmentos caracterizado por se utilizarem para o acoplamento os novos derivados de ácidos aminados da fórmula X - A - OObt, especialmente quando se utiliza o método de síntese em fase sólida.

No método de síntese por acoplamento de fragmentos em solução faz-se reagir um fragmento eventualmente protegido na presença de HOObt com um composto da fórmula X - A -

- OObt num solvente inerte apropriado a uma temperatura entre -20 e +50°C, de preferencia entre 0°C e a temperatura ambiente. Os solventes anteriormente mencionados, por exemplo, são apropriados, de preferencia DMF. Os fragmentos contendo arginina podem ser utilizados sob a forma dos respectivos percloratos solúveis, os quais podem ser obtidos in situ de modo conveniente por adição de perclorato de piridínio à mistura reaccional. Após terminada a reacção os grupos protectores introduzidos temporariamente podem ser opcionalmente aliminados de acordo com métodos conhecidos.

A síntese em fase sólida é iniciada a partir da extremidade C-terminal do peptideo com o acoplamento de um ácido aminado protegido a uma resina apropriada. Deste modo é possível preparar o composto de partida por reacção dum ácido aminado protegido com uma resina de polistireno ou de poliacrilamida modificada por meio da introdução de grupos clorometilo, hidroximetilo, benzidrilamino (BHA) ou metilbenzidrilamino (MBHA) por formação de uma ligação de éster ou de amida. As resinas utilizadas como material suporte são obteníveis comercialmente. Habitualmente utilizam-se resinas com grupos BHA ou MBHA quando se pretende obter um grupo amida livre na extremidade C-terminal do peptídeo sintetizado. No caso de se pretender sintetizar um peptídeo contendo uma amida secundária na extremidade C-terminal, utiliza-se uma resina com grupos clorometilo ou hidroximetilo e realiza-se a hidrólise com a amina correspondente. Se se pretende deixar ficar no peptídeo o grupo protector b-butilo das cadeias laterais dos ácidos aminados, realiza-se a síntese com o grupo protector Fmoc para bloqueio temporário do grupo α -amina dos ácidos aminados de acordo, por exemplo, com o método descrito em R.C. Sheppard, J.Chem. Soc. Chem. Comm. 1982, 587, protegendo a função guanidina da arginina de preferencia por protonação com perclorato de piridínio e efectuando a protecção dos restantes ácidos aminados funcionalizados da cadeia lateral com grupos protectores benzilo, por serem eliminàveis por transfer-hidrogenação (A. Felix et al. J. Org. Chem. 13, 4194 (1978) ou por tratamento com sódio em amoníaco líquido (W.Roberts, J.Am.Chem.Soc. 76 6203 (1954)).

Após eliminação dos grupos protectores das aminas dos ácidos aminados acoplados à resina, por meio de um reagente adequado, como por exemplo acido trifluoroacético em diclorometano no caso do grupo protector Boc ou uma solução a 20 % de piperidina em dimetilformamida no caso do grupo protector Fmoc, efectua-se o acoplamento dos ácidos aminados seguintes, devidamente protegidos, um após outro de acordo com a ordem pretendida.

O peptídeo intermediário resultante protegido na extremidade N-terminal e ligado à resina é desbloqueado com um dos reagentes anteriormente mencionados antes da reacção com o derivado do ácido aminado seguinte.

Para a pré-activação in situ dos derivados dos ácidos aminados podem ser utilizados todos os possíveis reagentes de activação usados na síntese de peptídeos, como os descritos em Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/2 especialmente as carbodiimidas, como por exemplo, N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, N,N'-diisopropilcarbodiimida ou N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. O acoplamento pode, neste caso, ser efectuado directamente por adição à resina de um derivado de um ácido aminado da fórmula X - A - OObt ou de um derivado de um ácido aminado pré-activado in situ e eventualmente de um aditivo redutor de racemização, como por exemplo, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (W.König, R.Geiger, Chem. Ber. 103 708 (1970)) ou 3-hidroxi-4-oxo-3,4-di-hidrobenzotriazina (HOObt) (W.König, R.Geiger, Chem. Ber. 103, 2054 (1970)).

O acoplamento ou, consoante o caso, a activação do derivado do ácido aminado com um dos reagentes de activação anteriormente mencionados pode ser efectuado nos solventes já citados, de preferencia em dimetilformamida ou em diclorometano ou numa mistura de ambos. A temperatura da reacção pode ser -20° a $+50^{\circ}C$, de preferencia de $0^{\circ}C$ até à temperatura ambiente. Habitualmente utiliza-se um excesso de 1,5 a 4 vezes do derivado activado do ácido aminado. No caso de resultar uma reacção de acoplamento incompleta, repete-se a reacção sem efectuar pri

meiro o desbloqueamento do grupo α -amina do peptideo ligado à resina, como seria necessário para o acoplamento do ácido aminado seguinte.

E possível confirmar a correcção do decurso da reacção de acoplamento por exemplo por reacção com anidrina, por exemplo pelo método descrito em E.Kaiser et al.Anal. Biochem. 34 595 (1970). Também é possível realizar a sintese de modo automático, por exemplo com um sintetizador de peptídeos modelo 430A da companhia Applied Biosystems, podendo utilizar-se tanto o programa de síntese pelo fabricante do aparelho como um programa preparado pelo próprio utilizador. Neste último caso utilizam-se em especial derivados de ácidos aminados protegidos pelo grupo Fmoc.

Após síntese dos peptídeos do modo anteriormente descrito, pode retirar-se o peptídeo da resina por meio de reagentes como sejam, por exemplo. fluoreto de hidrogénio líquido (preferido para os peptídeos preparados de acordo com o método Boc) ou ácido trifluoroacético (preferido para os peptídeos sintetizados de acordo com o método Fmoc.) Estes reagentes não só cindem a ligação entre o peptídeo e a resina como também eliminam os restantes grupos protectores das cadeias laterais dos derivados dos ácidos aminados. Deste modo obtém-se, excepto se a resina usada for BHA ou MBHA, o peptídeo sob a forma de ácido livre. Com a resina BHA ou MBHA obtém-se o peptídeo sob a forma de amida após hidrolise com fluoreto de hidrogénio. Se se pretender obter o peptídeo sob a forma de etilamida, então pode efectuar-se a hidrólise do peptídeo ligado à resina por meio de etilamina, devendo então efectuar-se em seguida a eliminação dos grupos protectores das cadeias laterais por meio de outros reagentes apropriados, como por exemplo os anteriormente mencionados.

Quando se efectua a hidrólise com fluoreto de hidrogénio ou com ácido trifluoroacético adiciona-se para a captura de catiões uma substância como as normalmente usadas para essa finalidade, por exemplo fenol, cresol, tiocresol, tioanisol, sulfureto de dimetilo, sulfureto de etilo e metilo ou uma

mistura de dois um mais reagentes. Também é possivel utilizar o ácido trifluoroacético em diluição num solvente apropriado como por exemplo em diclorometano.

No caso de se pretender obter o peptídeo contendo ainda os grupos t-butilo ou benzilo protegendo as cadeias laterais, efectua-se a síntese do peptídeo utilizando uma resina suporte especialmente modificada e hidroliza-se com ácido trifluoroacético a 1 % em diclorometano, de acordo com o método descrito por R.C.Sheppard, J.Chem.Soc.,Chem. Comm. 1982, 587. Se se pretender deixar nas cadeias laterais como grupos protectores unicamente os grupos t-butilo ou benzilo, utiliza-se uma combinação apropriada de métodos de síntese e de hidrólise.

Para a síntese de peptídeos com um agrupamento amida na posição C-terminal ou com um agrupamento ω-amino ou ω-guanidino, utiliza-se igualmente a resina suporte modificada descrita por Sheppard. Após a síntese retira-se da resina o peptídeo mantendo as protecções nas cadeias laterais e em seguida faz-se reagir com a amina com a ω-aminoalquilamina ou com a ω-guanidinoalquilamina correspondente, podendo durante esta reacção proteger-se de modo habitual temporariamente outros grupos funcionais eventualmente existentes.

Os exemplos apresentados seguidamente destinam-se a elucidar a invenção sem de qualquer modo restringir o respectivo âmbito.

A. Preparação do éster de OObt

Exemplo 1:

Fmoc-Ile-OObt

Dissolvem-se ou suspendem-se 50 mmol de Fmoc-Ile-OH juntamente com 50 mmol de HOObt em 100 ml de THF seco e a 0°C juntam-se 55 mmol de diciclo-hexilcarbodiimida.

Deixa-se reagir durante a noite, em seguida filtra-se a diciclo-hexilureia precipitada e elimina-se o solvente sob vácuo. Dissolve-se o resíduo em diclorometano e arrefece-se em banho de gelo. Nesta operação precipita novamente mais ureia. Filtra-se novamente e elimina-se o solvente restante sob alto vácuo. Tritura-se o resíduo com éter de petróleo filtra-se e seca-se sob alto vácuo.

Verifica-se a pureza do éster activo obtido por meio de CCF (gel de silica, usando acetato de etilo como eluente) e de HPLC (coluna $^{(R)}$Vydac C_{18} com um gradiente de 40 % de A [80 % de acetonitrilo/água com 0,1 % de ácido trifluoroacético] a 90 % de A em 0,1 % de ácido trifluoroacético no decurso de 30 minutos).

Rendimento: 15,5 g, $[\alpha]_D^{20} = -93,5^\circ$ (C = 1, DMF)

De modo análogo foram obtidos os seguintes ester activos:

Exemplo 2

Fmoc-Leu-OObt

$[\alpha]_D^{20} = -127,2^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 3

Fmoc-Asp (OtBu)-OObt

$[\alpha]_D^{20} = -61,5^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 4

Fmoc-Pro-OObt

P.F. 159 - 161°C (recristalização a partir de éter diisopropílico com pequena quantidade de isopropanol)

$[\alpha]_D^{20} = -144,5^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 5

Fmoc-Glu (OtBu)-OObt

P.F. superior a 95°C (decomposição; recristalizado a partir de isopropanol)

$[\alpha]_D^{20}$ = -94,5° (C = 1, DMF)

Exemplo 6

Fmoc-Gly-OObt

P.F. 149 - 151°C (recristalizado a partir de éter isopropílico com pequena quantidade de isopropanol)

Exemplo 7

Fmoc-Ala-OObt

P.F. 152 - 154°C $[\alpha]_D^{20}$ = -158° (C = 1, DMF)

Exemplo 8

Fmoc-Cys(tBu)-OObt

P.F. superior a 98°C (decomposição; recristalizado a partir de CH_2Cl_2/éter dietílico/éter diisopropilico)

$[\alpha]_D^{20}$ = -150,2° (C = 1, DMF)

Exemplo 9

Fmoc-Val-OObt

P.F. 114 - 116°C, $[\alpha]_D^{20}$ = -136,9° (C = 1, DMF)

Exemplo 10

Fmoc-Lys(Boc)-OObt

P.F. superior a 150°C (decomposição; recristalizado a partir de acetato de etilo/éter diisopropilico)

$[\alpha]_D^{20} = -37,1^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 11

Fmoc-Phe-OObt

P.F. 187 - 189°C (recristalizado a partir de CH_2Cl_2/éter dietílico)

$[\alpha]_D^{20} = -113,7^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 12

Fmoc-Tyr(tBu)-OObt

$[\alpha]_D^{20} = -85^\circ$ (C = 1, DMF)

Exemplo 13

Fmoc-Cys(4-MeOBzL)-OObt

P.F. 98 - 101°C (recristalizado a partir de CH_2Cl_2/éter de petróleo)

$[\alpha]_D^{20} = -75,5^\circ$ (C = 1, DMF)

B. Utilização dos éster activos de HOObt

B_1 Síntese em solução

Exemplo 14

Fmoc-Leu-Arg-OH

Adicionam-se à temperatura ambiente 5 g de Fmoc-Leu-OObt a uma mistura de 1,74 g de L-arginina, 1,63 g de HOObt e 1,79 g de perclorato de piridinio em 50 ml de dimetilformamida. Agita-se durante 3 horas à temperatura ambiente e deixa-se repousar durante a noite à temperatura ambiente. Concentra-se à secura a solução limpida resultante e trata-se o residuo com água. Ajusta-se o pH a 7 com uma solução aquosa de $NaHCO_3$. Filtra-se o precipitado, lava-se com água e seca-se.

Rendimento: 4,7 g, P.F. 145 - 155° C (com decomposição)

$[\alpha]_D^{23}$ = -18,5° (C = 1, metanol)

B_2 Síntese em fase sólida

Exemplo 15

H-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-OH

A síntese do decapeptídeo em epígrafe (ACP 65--74) é efectuada numa resina Pam da companhia Applied Biosystems carregada com glicina por meio dos ésteres de HOObt preparados de acordo com o processo da presente invenção. A síntese foi levada a efeito com o sintetizador de peptídeos modelo 430A da companhia Applied Biosystems. Carregou-se em cada um dos cartridges fornecidos com o sintetizador 1 mmol de um dos ésteres Fmoc-Val-OObt, Fmoc-Ala-OObt, Fmoc-Ile-OObt, Fmoc-Asp(OtBu)-OObt e Fmoc-Tyr(tBu)-OObt. Nos dois cartridges em que se carregaram cada um dos ácidos aminados Fmoc-Gln-OH e Fmoc-Asn-OH carregou-se juntamente em cada um 1,5 mmol de HOBT. A pré-activação destes ácidos aminados foi realizada directamente nos cartridges por dissolução em 4 ml de DMF e adição de 2 ml de uma solução 0,55 M de diisopropilcarbodiimida em DMF. Dissolveram-se os éste-

res de HOObt em 6 ml de DMF e bombearam-se as soluções assim obtidas para a resina previamente tratada com piperidina a 20 % em DMF, procedendo-se do mesmo modo com os ácidos aminados glutamina e asparagina pré-activados in situ. Para a síntese utilizou-se 0,5 mmol de resina-Gly e a glutamina e a asparagina foram acopladas em duplo. Após terminada a síntese retirou-se o peptídeo da resina com uma mistura 10:1 de ácido trifluoroacético e de ácido trifluorometanossulfónico com adição de m-cresol e de tioanisol para a captura de catiões. O peptídeo impuro foi isolado em (R)Sephadex G25 com ácido acético a 10 % com eluente. As fracções contendo o peptídeo foram reunidas e a pureza e a identidade do produto foram verificadas por HPLC.

Reivindicações

- 1ª -

Processo para a preparação de um derivado de um ácido aminado da fórmula

X - A - OObt

na qual

X significa um grupo protector de uretano,

A significa Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Cys(tBu), Cys(Acm), Met, Pro, Lys(Boc), Asp(OtBu), Glu(OtBu), Phe, Tyr(tBu), Trp, Lys(Z), Lys(Bzl) ou Cys(4-MeOBzl), podendo qualquer destes ácidos aminados ou derivados apresentar-se sob a forma L ou D

e

OObt significa 4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3-benzotriazina-3-iloxi, caracterizado por se fazer reagir um composto da fórmula X-A-OH, na qual X e A possuem os significados anteriormente definidos, com 3-hidroxi-4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3-benzotriazina (HOObt) na presença duma carbodiimida.

- 2ª -

Processo para a preparação de um peptídeo por acoplamento de fragmentos caracterizado por se utilizar como componente para o acoplamento pelo menos um composto da fórmula X-A-OObt, na qual X, A e OObt possuem os significados definidos na reivindicação 1.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se manter durante o decurso da síntese um fragmento ligado por uma ligação covalente a um corpo sólido.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 2 ou 3 caracterizado por o composto X-A-OObt ter sido obtido de acordo com a reivindicação 1.

A requerente declara que o primeiro pedido desta

- 4ª -

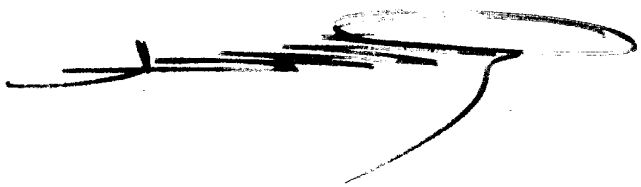
Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de o polímero adicionado às composições farmacêuticas líquidas para o controlo da espuma ser polietileno-polipropilenoglicol 1800.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de as composições farmacêuticas conterem um derivado de cefalosporina, em especial, Cefpirom, ou um derivado de penicilina, em especial, procaína-benzilpenicilina.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi depositado na República Federal Alemã em 30 de Maio de 1986, sob o nº. P 36 18 217.6.

Lisboa, 29 de Maio de 1987



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ESTERES DE 4-OXO-3,4-DI-HIDRO--1,2,3-BENZOTRIAZINA-3-ILOXI DE ÁCIDOS AMINADOS E DE PEPTIDEOS POR UTILIZAÇÃO DESSES ESTERES"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um derivado de um ácido aminado da fórmula

X - A - OObt

na qual

X significa um grupo protector de uretano

A significa Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Cys(tBu), Cys(Acm), Met, Pro, Lys(Boc), Asp(OtBu), Glu(OtBu), Phe, Tyr(tBu), Trp, Lys(Z), Lys(Bzl) ou Cys(4-Me-OBzl), podendo qualquer destes ácidos aminados ou derivados apresentar-se sob a forma L ou D
e

OObt significa 4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3-benzotriazina-3-iloxi, que compreende fazer-se reagir um composto da fórmula X - A -OH, na qual X e A possuem os significados anteriormente definidos, com 3-hidroxi-4-oxo-3,4-di-hidro-1,2,3--benzotriazina (HOObt) na presença duma carbodiimida.