

5 3

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 96 836**

**REQUERENTE:** BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã.

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO PEPTÍDIOS INIBIDORES DA COAGULAÇÃO SANGUINEA"

**INVENTORES:** Dr. Werner Stüber

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

República Federal Alemã, em 22 de Fevereiro de 1990, sob o N.º. P 40 05 591.4.

Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventor: Dr. Werner Stüber, residente na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA"

#### DESCR I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a peptídeos que inibem a coagulação sanguínea, a um processo para a sua preparação e à sua utilização como anticoagulantes.

Os anticoagulantes são de grande importância terapêutica para o tratamento de diferentes doenças que afectam a coagulação sanguínea, como a coagulação intravascular disseminada, o infarto do miocárdio e a trombose das veias profundas. Para a terapia destas doenças têm sido até agora utilizados anticoagulantes, como a antitrombina III obtida a partir de plasma humano.

Primitivamente foi experimentado como anticoagulante um polipeptídeo obtido da sanguessuga (*Hirudo medicinalis*) formado por 65 ácidos aminados. No entanto a utilização da hirudina, como é também conhecido este peptídeo, caracteriza-se por vários inconvenientes. Um inconveniente é a problemática da reduzida disponibilidade desta substância. O alto peso molecular relativo deste peptídeo pode também ser origem de dificuldades, devido ao potencial perigo de

7  
- formação de anticorpos.

Estes inconvenientes puderam ser ultrapassados por meio do desenvolvimento como anticoagulantes de peptídeos de baixo peso molecular que apresentam um alto grau de homologia em relação ao domínio C-terminal da hirudina. Estes peptídeos foram descritos no pedido EP-A 0 276 014, na Patente EP 0 333 356 e numa publicação de J. M. Maraganore et al., J. Biol. Chem. 264, 8692-8698 (1989).

Como se conclui das referências citadas, é de especial interesse um peptídeo com a estrutura Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH. Foi possível detectar uma actividade especialmente elevada num peptídeo cuja tirosina (Tyr) se encontra sulfatada no grupo fenólico. Este peptídeo corresponde de resto à hirudina nativa, cuja tirosina na posição 63 se encontra sulfatada.

São igualmente de interesse peptídeos cíclicos. Estes peptídeo contêm para além da sequência já referida o ácido aminado cisteína nas extremidades C- e N-terminais, o que permite uma ciclização por meio de um dissulfureto. Em vez de uma ponte de dissulfureto é possível utilizar outras funções químicas, de preferência um acoplamento por meio de uma ligação de amida.

Segundo a sua natureza química, uma tirosina sulfatada é um éster do ácido sulfúrico, de tal modo que a ligação entre o átomo de enxofre e o átomo de oxigênio fenólico pode ser cindida por hidrólise. Estes peptídeos têm a desvantagem de possuírem actividades anticoagulantes reduzidas.

De acordo com o estado da técnica, investigou-se por consequência a sulfatação da tirosina por meio de uma reacção química ulterior. Para este fim fizeram-se reagir os peptídeos de hirudina não sulfatados com diciclo-hexilcarbodiimida e ácido sulfúrico em solventes orgânicos. A sulfatação pode também ser conseguida por meio de uma reacção do peptídeo que contém por meio de trióxido de

sulfato de trietilamônio em piridina ou em piridina ou ácido clorosulfônico.

Estas reacções caracterizam-se no entanto pela desvantagem de darem lugar a reacções secundárias na fenilalanina ou a uma sulfatação não selectiva da vários resíduos de tirosina que estejam presentes. Por esta razão podem também resultar elevadas perdas de rendimento.

A presente invenção tem por conseguinte por objectivo evitar estes inconvenientes e proporcionar peptídeos com propriedades físicas, químicas e fisiológicas melhoradas.

Este objectivo foi atingido de forma surpreendente por meio da substituição nos peptídeos do ácido aminado tirosina ou Tyr ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) pelo ácido aminado Phe( $\text{SO}_3\text{H}$ ) ou Phe( $\text{PO}_3\text{H}_2$ ) ou Pgl( $\text{SO}_3\text{H}$ ) (Pgl significa fenilglicina) ou Pgl( $\text{PO}_3\text{H}_2$ ). O grupo sulfonato ou fosfato encontra-se de preferência situado na posição para do anel fenílico da fenilalanina, sendo no entanto igualmente possível uma ligação na posição meta.

A presente invenção refere-se por conseguinte a um peptídeo da fórmula geral:

A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-A11-A12-A13-A14-A15

em que

A1 significa hidrogénio, cisteína, um ou dois grupos alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, um grupo acilo com 2 a 10 átomos de carbono, um grupo acilo 2 a 10 átomos de carbono e adicionalmente um grupo carboxilo ou um grupo protector habitual da química dos peptídeos,

A2 significa uma ligação, Asn, Asp, Gln ou Glu,

A3 significa Glu ou Asp,

A5 significa Phe, Tyr, Trp, Pgl (fenilglicina) ou Na1 (naftilalanina),

A6 significa Glu ou Asp,

- A7 significa Glu, Asp, Pro ou Ala,
- A8 significa Ile, Leu, Val, Nle ou Phe,
- A9 significa Pro ou Hyp,
- A10 significa Glu ou Asp,
- A11 significa Glu ou Asp,
- A12 significa Phe(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência na posição p) ou  
significa Pgl(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência na posição p),
- A13 significa uma ligação, Leu, Ile, Val ou Ala,
- A14 significa uma ligação, Gln, Asn, Glu, Asp ou Cys e
- A15 significa Cys, Cys-amida, um grupo OH do grupo alfa-carboxilo, livre ou esterificado com um álcool inferior com um máximo de 4 átomos de carbono, que também se pode apresentar sob a forma de uma função carboxamida, cujo hidrogênio pode ser eventualmente substituído por grupos alquilo com um máximo de 4 átomos de carbono.

Se A1 é o ácido aminado cisteína, o grupo amina também pode ser acetilado.

A síntese dos peptídeos da presente invenção pode ser efectuada de acordo com métodos bem conhecidos em si (G. Barany e R. B. Merrifield em "The Peptides" (E. Gross e I. Meienhofer, Ed.)).

Os ácidos aminados Phe(SO<sub>3</sub>H) ou Pgl(SO<sub>3</sub>H) podem ser obtidos por sulfonação de fenilalanina ou de feniglicina, respectivamente, podendo apresentar-se nas formas D, L ou DL, de preferência na forma L. Como agente de sulfonação pode usar-se ácido sulfúrico, que de preferência deve conter ainda trióxido de enxofre.

Estes ácidos aminados sulfonados foram protegidos nos grupos amina com um grupo protector de acordo com o processo conhecido de C. D. Chang et al., Int. J. Peptide Protein Res. 15, 59 (1980), a fim de tornar possível

a preparação dos peptídeos da presente invenção. Os grupos protectores usados podem ser, por exemplo: os grupos Boc, Z, Bpoc, Ddz e de preferência Fmoc.

A preparação dos peptídeos é efectuada por um método de síntese de peptídeos em solução mediante o emprego de metodologias conhecidas (E. Wünsch em "Houben-Weyl, Synthese vom Peptiden I", G. Thieme Verlag, Estugarda (1974) ou por métodos em fase sólida igualmente conhecidos (ver acima), utilizando-se de preferência o grupo protector Fmoc.

Os grupos sulfonato ou fosfato são utilizados na síntese sem protecção

No método da síntese peptídica em fase sólida, a cadeia peptídica é construída num suporte de poliestireno (designado em seguida por resina) reticulado (1 % de divinilbenzeno). Para a síntese de peptídeos com grupos carboxilo livres utilizou-se uma ancoragem com base em álcool alcóxibenzílico. Para amidas peptídicas utilizaram-se ancoragens de amida (Int. J. Peptide Protein Res. 34, 262-267, 1989) que produzem peptidamidas não alquiladas. A incorporação de cada ácido aminado protegido é efectuada de acordo com a seguinte rotina repetitiva:

- Carga do ácido Fmoc-aminado-resina (ou âncora de amida-resina) num sintetizador de peptídeos automático
- Lavagem da resina com DMF, diclorometano ou N-metilpirrolidona (cerca de 15 ml/mg)
- Cisão dos grupos Fmoc com piperidina a 20 % em dimetilformamida ou N-metilpirrolidona (de preferência 1 x 3 min e 1 x 10 min)
- Eliminação da piperidina por lavagem com DMF, diclorometano, N-metilpirrolidona ou um álcool, de preferência isopropanol
- Acoplamento do ácido aminado com uma carbodiimida, de preferência com diisopropilcarbodiimida, eventualmente

com adição de HOBt, HOSu ou com utilização de BOP ou TBTU eventualmente com adição de HOBt, de preferência em DMF ou em N-metilpirrolidona.

As cadeias laterais dos ácidos aminados trifuncionais são protegidos como se segue:

- Asp e Glu sob a forma de ésteres de t-butilo
- Hyp e Tyr sob a forma de ésteres de t-butilo
- Cys sob a forma de éter tritílico ou de dissulfureto de terc-butilo

Em vez da química de Fmoc anteriormente apresentada estes peptídeos podem também ser preparados com a estratégia de Boc (J. M. Stewart e J. D. Youg "Solid Phase Peptids Synthesis" Pierce Chemical Co., 1984, págs. 71-95), uma vez que o grupo sulfonato não é influenciado pela utilização repetitiva de ácido trifluoroacético.

Os peptídeos são separados da resina quando se utiliza a química de Fmoc por meio de ácido trifluoroacético, de preferência com adição de um aceitador de ureia, e são cristalizados com éter. Após purificação por meio de cromatografia de fase invertida confirma-se a sua composição por meio de análise de ácidos aminados e de espectrometria de massa FAB.

Quando se preparam peptídeos que contém cisteína, no caso de Cys(Trt) elimina-se o grupo protector tritilo simultaneamente com a separação do peptídeo da resina, contanto que a mistura de hidrólise contenha um tiol, de preferência etanoditiol, como aditivo.

Quando se utiliza Cys(StBu), de preferência elimina-se o grupo S-tBu após hidrólise do peptídeo. Para este fim torna-se necessária a utilização de processos conhecidos, como por exemplo o tratamento com tri-n-butilfosfina ou de ditiotreitól. De preferência utiliza-se a eliminação dos grupos protectores com ditiotreitól.

A ciclização por meio de pontes S-S pode ser efectuada por meio de processos oxidativos conhe-

cidos.

De preferência dissolve-se o peptídeo que contém cisteína numa concentração de 0,1 a 0,001 mM em tampão de hidrogenocarbonato de amónio (0,01 M) e agita-se ao ar durante várias horas. A ciclização é seguida por HPLC.

São para este fim também adequados outros processos de ciclização, como por exemplo oxidações como iodo, por exemplo em ácido acético, ou  $K_3 [Fe(CN)_6]$ .

Em alternativa é possível a preparação segundo um processo que decorre em solução, sendo neste caso em primeiro lugar preparados fragmentos simples do peptídeo pretendido. A condensação de ácidos aminados protegidos isolados formando segmentos peptídicos é efectuada num solvente como DMF ou tetra-hidrofurano ou em misturas destes solventes. O acoplamento dos ácidos aminados é efectuado por meio de carbodiimidias, como no caso da síntese em fase sólida. Reunem-se os segmentos simples de modo a formar os peptídeos pretendidos. Após eliminação dos grupos protectores purificam-se igualmente os peptídeos e caracterizam-se.

A actividade dos peptídeos é determinada por meio de um ensaio funcional.

Os peptídeos preparados são os apresentados em seguida, não devendo no entanto considerar-se o âmbito da presente invenção restrito a estes:

Abreviaturas:

Asn	L-Asparagina
Asp	Ácido L-aspártico
Cys	L-Cisteína
Gln	L-Glutamina
Glu	Ácido L-glutâmico
Gly	Glicina
Ala	L-Alanina
Tyr	L-Tirosina

Phe	Fenilalanina
Trp	L-Triptofano
Pgl	L-Fenilglicina
Pro	L-Prolina
Ile	L-Isoleucina
Leu	L-Leucina
Nle	Norleucina
Val	L-Valina
Nal	L-Naftilalanina
Hyp	L-Hidroxiprolina
Boc	t-Butiloxicarbonilo
Z	Benziloxicarbonilo
Bpoc	Bifenilildimetoxibenziloxicarbonil
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonilo
DMF	Dimetilformamida
HOBt	1-Hidroxisuccinimida
Ac	Acetilo
Suc	Succinimidilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tris-(di- metilamino) fosfônico
TBTU	tetrafluorofosfato de 2(1H-Benzotriazolil-1)-1,1,3,3- -tetrametil-urônico
Osn	éster de succinimida
TFA	Ácido trifluoroacético
DIC	Diisopropilcarbodiimida
S-tBu	terc-Butiltio
Trt	Tritilo
FAB	Fast Atom Bombardment

#### Exemplos

##### Exemplo 1

##### Preparação de Fmoc-Phe(SO<sub>3</sub>H)

Dissolveram-se 20 gramas de L-fenilalanina numa mistura de 17 ml de oleum (ácido sulfúrico concentrado contendo trióxido de enxofre em excesso) a 30 % e 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Aqueceu-se a mistura

reaccional durante 1 hora a 100°C e em seguida verteu-se sobre 200 ml de água gelada.

Neutralizou-se o ácido com hidróxido de bário e separou-se o sulfato de bário por filtração. Cromatografou-se o filtrado através de uma coluna (Dowex 50WX2, 50-100 mesh, dimensões 230 x 32 mm) usando água como eluente. Após evaporação do solvente obtiveram-se 18,5 gramas de L-para-sulfofenil-alanina.

Retomaram-se 7,35 gramas do ácido aminado em 150 ml de uma solução de carbonato de sódio a 10%. A esta solução adicionou-se uma solução de 10 gramas de Fmoc-OSu em 300 ml de dioxano com agitação. A mistura reaccional tornou-se imediatamente gelatinosa e foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Separou-se o precipitado por filtração e eliminou-se o dioxano por evaporação. Extraiu-se a solução aquosa 3 x com éster e acidificou-se com ácido clorídrico 1 N até pH 2.

Extraiu-se uma impureza residual com acetato de etilo. Evaporou-se a fase aquosa à secuta com um evaporador rotativo e secou-se a resíduo cristalino sob vácuo sobre Sicapent<sup>R</sup>.

#### Exemplo 2

Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH

Prepararam-se 0,83 gramas de resina-Fmoc-Leu (0,5 mmol) num sintetizador de peptídeos da firma Advanced Chemtec (Louisville, Kentucky, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para o acoplamento do próximo ácido aminado. Dissolveram-se Fmoc-Phe(SO<sub>3</sub>H) (1,5 mmol) e 2,25 mmol em 15 ml de DMF e 15 ml de DMSO e trataram-se com 1,6 mmol de DIC. Após uma hora adicionou-se a mistura reaccional a resina-Leu e procedeu-se à operação de acoplamento durante duas horas. Em seguida comprovou-se a síntese de acordo com procedimento normais. Para o acoplamento utilizou-se TBTU com um excesso de 3 vezes do ácido aminado. O período de acop-

lamente foi de 35 minutos de cada vez. Tratou-se a resina-peptídeo com 27 ml de TFA, 1,5 ml de etanoditiol e 1 g de resorcina durante uma hora. Cristalizou-se a solução do peptídeo em éter, separou-se por filtração e secou-se. O rendimento antes da purificação foi de 405 mg. Purificaram-se 110 mg deste peptídeo impuro numa coluna de HPLC (Shandon, RP-18, 250 x 20 mm) com um gradiente de 0,1 TFA/acetonitrilo. Isolou-se o peptídeo por liofilização (rendimento 48 mg). Após hidrólise determinou-se um conteúdo em peptídeo de 87%.

A composição em ácidos aminados é apresentada no Quadro seguinte e corresponde aos valores esperados.

Análise de ácidos aminados:	Phe(SO <sub>3</sub> H)	0,95 (1)
	Asp	1,95 (2)
	Glu	4,18 (4)
	Pro	1,10 (1)
	Gly	1,00 (1)
	Ile	0,90 (1)
	Leu	0,90 (1)
	Phe	0,99 (1)

Ensaio:

Dissolveram-se 10 mg do peptídeo em 1 ml de tampão (tris 20 mM e NaCl 150 mM a pH 7,5). Ensaiou-se o peptídeo no tempo de tromboplastina parcial (TTP) em comparação com um peptídeo com a mesma sequência, que continha no entanto Tyr no lugar de Phe(SO<sub>3</sub>H).

Ensaio de TTP:

100 microlitros de plasma humano normal  
100 -"- de tampão (ver acima)  
100 -"- de reagente de caolina/patromtina (BEHRINGWERKE AG)  
2 minutos a 37°C  
100 microlitros de solução de CaCl<sub>2</sub>

Resultados:

Diluição	Tempo de coagulação em segundos	
	Peptídeo segundo o Exemplo	Peptídeo com Tyr
1:4	147.2	105.2
1:8	111.8	80.5
1:16	89.2	71.0
1:32	81.5	65.0
1:64	72.8	57.7
1:128	63.0	52.8
1:256	56.3	47.3
1:512	52.2	44.7
1:1024	46.8	41.7

Valor do branco (sem peptídeo) 38,8

As análises de ácidos aminados e de espectro de massa por FAB correspondente estão em concordância com os resultados esperados.

Do mesmo modo foram preparados os seguintes peptídeos:

H-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH  
Ac-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe-(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Sar-Glu-Tyr-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ile-OH  
Ac-Asn-Ala-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
H-Asp-Trp-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH  
H-Asn-Gly-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe-(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
H-Asp-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Asp-OH  
Suc-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Suc-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Ac-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Nle-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ile-Asn-NH<sub>2</sub>  
Ac-Gly-Asp-Tyr-Glu-Glu-Val-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-NH<sub>2</sub>  
Suc-Glu-Ala-Asp-Tyr-Glu-Pro-Leu-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Ac-Gln-Ala-Asp-Phe-Asp-Asp-Phe-Asp-Asp-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ala-NH<sub>2</sub>  
Ac-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-D-Leu-OH  
Ac-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-D-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH  
H-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Pgl(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Ac-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Pgl(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH

Ac-Asp-Nal-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
Cys-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-  
-Cys-OH  
Cys-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-  
-Gln-Cys-OH  
Cys-Asn-Gly-Asp-Tyr-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-  
-Cys-OH

### R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de um  
peptídeo da fórmula I

A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-A11-A12-A13-A14-A15-

em que

- A1 significa hidrogênio, cisteína, acetilcisteína, um ou dois grupos alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, um grupo acilo com 2 a 10 átomos de carbono, um grupo acilo 2 a 10 átomos de carbono e adicionalmente um grupo carboxilo ou um grupo protector habitual da química dos peptídeos.
- A2 significa uma ligação, Asn, Asp, Gln, ou Glu,
- A3 significa uma ligação, Gly ou Ala,
- A4 significa Glu ou Asp,
- A5 significa Phe, Tyr, Trp, Pgl (fenilglicina) ou Nal (naftilalanina)
- A6 significa Glu ou Asp,
- A7 significa Glu, Asp, Pro ou Ala,
- A8 significa Ile, Leu, Val, Nle ou Phe,
- A9 significa Pro ou Hyp,

- A10 significa Glu ou Asp,  
A11 significa Glu ou Asp,  
A12 significa Phe(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência na posição p) ou  
significa Pgl(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência p),  
A13 significa uma ligação, Leu, Ile, Val ou Ala,  
A14 significa uma ligação, Gln, Asn, Glu, Asp ou Cys e  
A15 significa Cys, Cys-amida, um grupo OH do grupo alfa-carbonilo, livre ou esterificado com um álcool inferior com um máximo de 4 átomos de carbono, que também se pode apresentar sob a forma de uma função carboxamida, cujo hidrogênio pode ser eventualmente substituído por grupos alquilo com um máximo de 4 átomos de carbono,

caracterizado por a síntese ser efectuada por meio de síntese no estado sólido ou de síntese em solução.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a cadeia peptídica ser construída num suporte polimérico por meio de acoplamento repetitivo de ácidos aminados ou de oligopeptídeos e por em seguida se cindirem estes.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a cadeia peptídica ser construída em solução utilizando ácidos aminados protegidos ou oligopeptídeos protegidos e o peptídeo ser recuperado por eliminação dos grupos protectores.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por os derivados dos ácidos aminados ou os segmentos peptídicos serem acoplados uns aos outros em solução ou sobre uma fase sólida e o peptídeo ser obtido por eliminação dos grupos protectores bem como, no caso de síntese em fase sólida, por cisão a partir da resina de suporte, poden-

- do seguir-se no caso de peptídeos que contém cisteína uma operação de fecho de anel oxidativa.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicações 1 a 4 caracterizado por no peptídeo obtido o resíduo A12 ser sulfonilfenilalanina na forma D ou L.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicações 1 a 4 caracterizado por no peptídeo obtido o resíduo A12 ser sulfonilfenilglicina na forma D ou L.

- 7ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por no peptídeo obtido o resíduo A1 ser hidrogénio, metilo, acetilo, benzóilo ou succinilo.

- 8ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por o peptídeo obtido ter a estrutura H-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH.

- 9ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado por o peptídeo obtido ter a estrutura H-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH,  
Ac-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
Sar-Glu-Tyr-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ile-OH,  
Ac-Asn-Ala-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,

- 14 -

H-Asp-Trp-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH,  
H-Asn-Gly-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
H-Asp-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Asp-OH,  
Suc-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe-(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
Suc-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
Ac-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Nle-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ile-Asn-NH<sub>2</sub>,  
Ac-Gly-Asp-Tyr-Glu-Glu-Val-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-LeuNH<sub>2</sub>,  
Suc-Glu-Ala-Asp-Tyr-Glu-Pro-Leu-Pro-Glu-Glu--Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
Ac-Gln-Ala-Asp-Phe-Asp-Asp-Phe-Asp-Asp-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Ala-NH<sub>2</sub>,  
Ac-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-D-Leu-OH,  
Ac-Gly-Asp-Ph-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-D-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln-OH,  
H-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Pgl(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH,  
Ac-Asp-Pgl-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Pgl(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH  
ou  
Ac-Asp-Nal-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(SO<sub>3</sub>H)-Leu-OH.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente alemão apresentado em 22 de Fevereiro de 1990, sob o nº. P 40 05 591.4.

Lisboa, 21 de Fevereiro de 1991.

O AGENTE OFICIAL DO PROPRIETÁRIO INDUSTRIAL



## R E S U M O

### "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um peptídeo da fórmula I

A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9-A10-A11-A12-A13-A14-A15

em que

- A1 significa hidrogênio, cisteína, acetilcisteína, um ou dois grupos alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, um grupo acilo com 2 a 10 átomos de carbono, um grupo acilo 2 a 10 átomos de carbono e adicionalmente um grupo carboxilo ou um grupo protector habitual da química dos peptídeos,
- A2 significa uma ligação, Asn, Asp, Gln, ou Glu,
- A3 significa uma ligação, Gly ou Ala
- A4 significa Glu ou Asp,
- A5 significa Phe, Tyr, Trp, Pgl (fenilglicina) ou Nal (naftilalanina),
- A6 significa Glu ou Asp,
- A7 significa Glu, Asp, Pro ou Ala,
- A8 significa Ile, Leu, Val Nle ou Phe,
- A9 significa Pro ou Hyp,
- A10 significa Glu ou Asp,
- A11 significa Glu ou Asp,
- A12 significa Phe(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência na posição p) ou  
significa Pgl(SO<sub>3</sub>H) ou Phe(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (de preferência na posição p),
- A13 significa uma ligação, Leu-Ile, Val ou Ala,
- A14 significa uma ligação, Gln, Asn, Glu, Asp, ou Cys e
- A15 significa Cys, Cys-amida, um grupo OH do grupo alfa-carboxilo, livre ou esterificado com um álcool inferior com um máximo de 4 átomos de carbono

que também se pode apresentar sob a forma de uma função carboxamida, cujo hidrogénio pode ser eventualmente substituído por grupos alquilo com um máximo de 4 átomos de carbono, em que a síntese é efectuada por meio de síntese no estado sólido ou de síntese em solução.