


12. AGO. 1991

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS QUE ANTAGONIZAM NEUROQUININA A, E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTEM"

A presente invenção refere-se ao processo para a preparação de péptidos sintéticos lineares e cíclicos com a formula (I)



na qual $Y = A-R$,

em que A é um dos seguintes aminoácidos

Lys, Orn, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Ala, β Ala,
Val, Leu, Nle, Ile, Gly, Pro, Trp, Ser, Thr;
e R = NH_2 (carboxamida de extremidade C)

ou

A é um dos seguintes aminoácidos

Arg, Lys, Orn, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Ala,
 β Ala, Val, Leu, Nle, Ile, Gly, Pro, Phe, Trp,
DTrp, Tyr, Met, Ser, Thr;

quando R e X conjuntamente constituem uma ligação de amida que une as duas extremidades da cadeia de péptidos para originar um péptido cíclico;

e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicas e inorgânicas.

Estes compostos são antagonistas competitivos de neuroquinina A e são intensamente selectivos para o receptor NK-2.

2 AGO. 1991

1 CAMPO DA INVENÇÃO

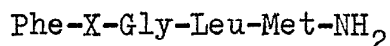
A presente invenção refere-se a peptídeos lineares e cíclicos que antagonizam neuroquinina A.

5 A invenção refere-se também a sais dos citados peptídeos e aos processos para a preparação dos mencionados peptídeos e respectivos sais.

As abreviaturas utilizadas constam de uma lista no fim da presente memória descritiva.

ENQUADRAMENTO GERAL DA INVENÇÃO

10 As taquiquininas são um grupo de peptídeos que têm a mesma sequência na extremidade de C



15 Nos mamíferos, foram identificados, pelo menos, três peptídeos pertencentes a este grupo, nomeadamente a substância P (SP), a neuroquinina A (NKA) e a neuroquinina B (NKB). Verificou-se que estes peptídeos actuam como neurotransmissores, tanto periféricamente como centralmente. Veja-se J. E. Maggio, Peptides 1985, 6, 237 - 245 e P.C. Emson e col., em Neuropeptides and their Peptidases, Ed. A. J. Turner, Ellis Horwood, Inglaterra, 1987, páginas 87 - 106.

20 Os resultados farmacológicos e bioquímicos referidos na literatura mostram que a actividade biológica das taquiquininas é mediada, no tecido dos mamíferos, por, pelo menos, três receptores separados, conhecidos como NK-1, NK2 e NK-3. Veja-se S.H. Buck e col., Science 1984, 226, 987 - 989; R. Laufer e col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 7444 - 7449 e C. M. Lee e col., Eur. J. Pharmacol., 1986, 130, 209 - 216. As taquiquininas naturais mostram uma afinidade variável para estes três receptores: SP, NKA e NKB são os agonistas mais poderosos dos receptores NK-1, NK-2 e NK-3, respectivamente. No entanto, em elevadas concentrações, as três taquiquininas naturais podem estimular cada um destes três receptores em grau idêntico, em virtude da sua sequência de extremidade C comum. O desenvolvimento de antagonistas capazes de bloquear selectivamente um dos três

25

30

35


12 AGO. 1991

1 receptores para as taquiquininas parece ser, portanto, da
maior importância. A primeira geração de antagonistas de ta-
quiquinina, como se descreve, por exemplo, na Patente de In-
venção Norte-Americana Número 4 481 139, apresentava, de fa-
5 to, uma pequena selectividade (S. H. Buck e S. A. Shtatzer,
Life Sci., 1988, 42, 2701 - 2708). Fazendo substituições de
aminoácidos do mesmo tipo, mas na sequência da extremidade
C de NKA, que é, em si própria, mais selectiva do que SP,
descobriram-se já (veja-se Patente de Invenção Italiana Nú-
10 mero 9432 A/89) antagonistas de peptidos da segunda geração,
com boa selectividade para o receptor NK2.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objecto da presente invenção é constituído por pep-
tidos sintéticos lineares e cíclicos com a fórmula geral I

15 X-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Y

na qual

Y = A-R, em que A é um dos seguintes aminoácidos : Lys, Orn,
Glu, Gln, Asp, Asn, His, Ala, β Ala, Val, Leu, Nle, Ile, Gly,
Pro, Trp, Ser, Thr;

20 R = NH₂ (carboxamida da extremidade C);

X = H (grupo amino livre da extremidade N);

ou

A é um dos seguintes aminoácidos : Arg, Lys, Orn, Glu, Gln,
Asp, Asn, His, Ala, β Ala, Val, Leu, Nle, Ile, Gly, Pro, Phe,
25 Trp, DTrp, Tyr, Met, Ser, Thr;

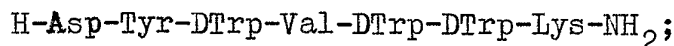
quando R e X, em conjunto, constituem uma ligação de amida
que liga as duas extremidades da cadeia de peptido para for-
mar um peptido cíclico;

e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis derivados de á-
cidos ou bases orgânicos e inorgânicos. Estes peptidos pos-
30 suem antagonismo competitivo de neuroquinina A e também têm
um elevado grau de selectividade em relação ao receptor
NK-2.

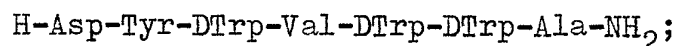
Os aminoácidos seguintes, mais particularmente, fa-
35 zem parte do âmbito da presente invenção

al 27/10/81

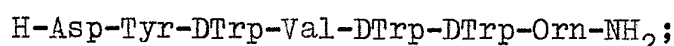
- 1 - um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



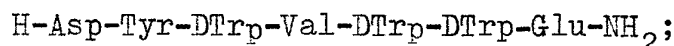
- 5 - um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



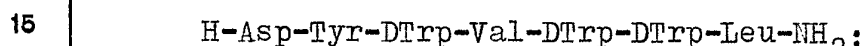
- um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



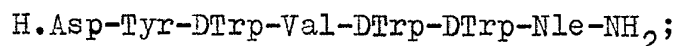
- 10 - um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



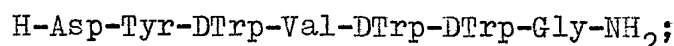
- um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



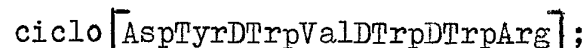
- um heptapeptido linear com a seguinte fórmula de estrutura:



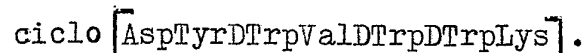
- 20 - um heptapeptido cíclico com a seguinte fórmula de estrutura:



- um heptapeptido cíclico com a seguinte fórmula de estrutura:



- 25 - um heptapeptido cíclico com a seguinte fórmula de estrutura:



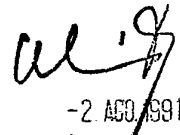
Os novos peptidos a que se refere o presente pedido de patente podem reduzir ou antagonizar os efeitos patológicos de um excesso de neuroquinina A; são, portanto, úteis no tratamento de artrite, asma, inflamação, desenvolvimento de tumores, hipermotilidade gastrointestinal, coreia de Huntington, neurite, neuralgia, enxaqueca, hipertensão, incontinência urinária, urticária, sintomas do síndrome carcinóide, influenza e constipação vulgar.

35

at-8
-2 AGO. 1991

1 Os peptidos lineares e cíclicos que são objecto da
presente invenção podem preparar-se pelos métodos conhecidos
da síntese de peptidos, tanto em solução como em fase sólida
como se descreve, por exemplo, em M. Bodanszky, ^{A. Bodanszky} "the Practi-
5 ce of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, Berlin, Heidel-
berg, 1984; J. Stewart e J. Young, "Solid Phase Peptide Syn-
thesis", Pierce Chemical Co., Rochford, 1984; E. Atherton e
R. C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press,
Oxford, 1989. A título de exemplo, não restritivo descreve-
10 -se o processo de síntese em fase sólida para a obtenção de
peptidos lineares, e o processo de síntese e ciclização em
fase sólida para a obtenção de peptidos cíclicos.

Para se obterem peptidos lineares, com o grupo car-
boxilo na extremidade C sob a forma de carboxamida, pelo pro-
15 cesso em fase sólida, podem utilizar-se suportes sólidos,
tais como a resina 4-metil-benz-hidrilamina (MBHA) ou a "re-
sina para peptidos sob forma de amida com estratégia Fmoc"
(Dod), descrita por J. Knolle e col., Tetrahedron Lett.,
1987, 28, 5651. No primeiro caso, a função alfa-amino dos
20 aminoácidos é protegida pelo grupo t-butiloxi-carbonilo
(Boc), que pode ser selectivamente desprotegido com ácido
triflúor-acético, sendo a desprotecção final, com simultâ-
nea separação do peptido sob a forma de amida do polímero de
suporte, realizada com ácido fluorídrico anidro. No caso da
25 resina Dod, a função de alfa-amina dos aminoácidos é prote-
gida pelo grupo 9-fluorenil-metoxi-carbonilo (Fmoc), que po-
de ser desprotegido selectivamente com piperidina, sendo a
desprotecção final, com simultânea separação do peptido sob
a forma de amida do polímero de suporte, realizada com ácido
30 triflúor-acético. Em ambos os casos, as cadeias laterais dos
aminoácidos trifuncionais podem ser protegidas por métodos
conhecidos descritos na literatura. Para construir a cadeia
de peptido sobre o suporte de polímero insolúvel, cada ami-
noácido é feito reagir, tal como se encontra, isto é, sob a
35 forma de ácido livre, na presença de um agente de acopla-


-2. AGO. 1991

1 mento apropriado, tal como diciclo-hexil-carbodiimida (DCC),
e, se necessário, com adição de aditivos apropriados, tais
como hidroxibenzotriazol (HOBT) ou hexafluorofosfato de ben-
zotriazolil-N-oxi-tris-dimetilaminofosfónio (BOP); como va-
5 riante, pode fazer-se reagir o aminoácido sob a forma de a-
nidrido simétrico, ou éster activo, ou de acordo com qual-
quer um dos outros métodos descritos na literatura. O com-
pletamento das reacções de acoplamento dos aminoácidos pode
ser verificado pelo teste com nin-hidrina, tal como é des-
10 crito por E.T. Kaier e col., Anal. Biochem., 1970, 34, 595.
Depois de o peptido bruto, apropriadamente liofilizado, ter
sido separado da resina, é purificado para se tornar homogé-
neo, por exemplo, por métodos cromatográficos, tais como cro-
matografia preparativa sob alta pressão em fase inversa.

15 Para sintetizar os peptidos cíclicos, pode empregar-
-se o método de ciclização em solução, sendo o precursor li-
near do peptido cíclico pretendido preparado, primeiramente,
por um dos métodos acima descritos, ou em solução, ou em fa-
se sólida. A ciclização realiza-se com o auxílio de agentes
de condesação apropriados e, caso seja necessário, activan-
20 do o grupo carboxilo da extremidade C do precursor linear,
por exemplo, sob a forma de azida. Como variante, pode utili-
zar-se, adequadamente um método de ciclização em fase sólí-
da graças à presença, na sequência a sintetizar, de um resí-
duo de ácido aspártico que pode ser ligado covalentemente a
25 uma resina apropriada, como por exemplo, resina de fenilace-
tamidometilo (PAM), pela função carboxilo na posição beta.
Subsequentemente, quando a função carboxilo na posição alfa
tiver sido protegida sob a forma de éster de fluorenilmeti-
lo, pode efectuar-se o alongamento da cadeia
30 pela estratégia normal Boc, acima esquematizada para a sín-
tese dos peptidos lineares. Tendo-se obtido o precursor li-
near, novamente acoplado à resina pela cadeia laterar de
ácido aspártico, é, então possível desproteger selectiva-
mente o grupo carboxilo na posição alfa do ácido aspár-
35 -

al. 8
-2 AGO. 1981

1 tico propriamente dito, e realizar a ciclização por conden-
sação intramolecular entre o grupo carboxilo na posição alfa
do ácido aspártico eo prupo amino na posição alfa do amino-
5 ácido na extremidade N da mesma cadeia. Esta condensação rea-
liza-se convenientemente na presença de hexafluorofosfato de
benzotriazolil-N-oxi-tris-dimetilaminofosfônio (BOP). O pe-
ptido cíclico é, depois, desprotegido e separado do suporte
sólido com o auxílio de ácido fluorídrico anidro. O peptido
10 cíclico bruto assim obtido pode ser facilmente purificado
por processos cromatográficos preparativos sob alta pressão
em fase inversa.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Exemplo 1

Síntese do Peptido Linear com a Seguinte Sequência :

15 H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Lys-NH₂.

Coloca-se 1,0 grama de resina DOD (Bachem, Suíça),
equivalente a 0,50 milimole de grupos amino, na câmara de
reação de um sintetizador de peptidos semi-automático Labor-
tec SP 640. Em seguida, lava-se a resina de acordo com o pro-
20 tocolo apresentado na tabela 1 abaixo indicada, ciclos 7 - 8
é, depois, desprotegida (ciclos 1 - 3), e de novo lavada
(ciclos 4 - 8). Para acoplar o aminoácido da extremidade N
à resina, adiciona-se uma solução de HOBT (0,306 grama) e
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,702 grama) em 10 ml de DCM/DMF (2/1 em
25 volume/volume) à resina desprotegida. Agita-se a resina du-
rante dois minutos (ciclo 9), em seguida adiciona-se uma so-
lução 1 M de DCC (1,5 ml) em DCM/DMF (2/1 volume/volume) e
continua-se a agitação à temperatura ambiente durante mais sessen-
ta minutos (ciclo 10). Realizam-se então os procedimentos de
30 lavagem (ciclos 11 - 14) e verifica-se se a reação está
completa pelo ensaio de ninhidrina, tal como é descrito por
Kaiser. Se o resultado for negativo, hidrolisa-se o grupo
Fmoc com PIP (ciclos 1 - 8) antes de se proceder ao acopla-
mento do aminoácido seguinte, que se efectua da mesma manei-
35 ra. Fazem-se reagir os resíduos seguintes pela ordem e nas

al:8
-2 AUG 1991

1 quantidades mencionadas : Fmoc-DTrp-OH (0,639 gramas), Fmoc-
-DTrp-OH (0,639 gramas), Fmoc-Val-OH (0,509 gramas), Fmoc-
-DTrp-OH (0,639 gramas), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (0,689 gramas) e
5 Fmoc-Asp(OtBu)-OH (0,617 gramas). Depois do último acopla-
mento, desprotegeu-se o grupo amino da extremidade N^{da} do pepti-
do ligado à resina (ciclos 1 - 3), lava-se o peptido (ciclos
4 - 8) e seca-se sob vácuo, obtendo-se 1,60 gramas de produ-
to seco. Para a desprotecção final, coloca-se o peptido li-
gado à resina num balão de 250 ml que contém 27 ml de TFA,
10 1,5 ml de p-cresol e 1,5 ml de etanoditiol. Agita-se a sus-
pensão resultante a 37° C, durante duas horas, separa-se,
depois a resina por filtração e lava-se com três volumes de
5 ml de TFA. Dilui-se a solução resultante com 250 ml de
éter etílico frio mais 150 ml de éter de petróleo frio, o
15 que provoca a precipitação de um sólido branco. Arrefece-se
a suspensão a -78° C e filtra-se o peptido bruto, lava-se
com éter frio por três vezes, dissolve-se em água e liofili-
za-se para se obter 0,375 gramas de produto bruto. Final-
mente, purifica-se o peptido por cromatografia líquida em
20 fase inversa e analisa-se por HPLC analítica numa coluna
Waters C₁₈ Deltapak, de 3,9 x 150 milímetros, com um gra-
diente de acetonitrilo contendo 0,1% (volume/volume) de áci-
do triflúor-acético (fase B) contra 0,1% (volume/volume) de
ácido triflúor-acético aquoso (fase A), entre 20 e 80% de B,
25 durante vinte minutos, com um caudal de 1 ml/minuto, utili-
zando detecção por UV a 210 nm.

Tempo de retenção (Rt) = 9,6 minutos; pureza cromatográfica $\geq 99\%$.

Exemplo 2

Síntese do Peptido Linear com a Seguinte Sequência :

H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Ala-NH₂.

Coloca-se 1,0 grama de resina de MBHA (Nova-biochem, Suíça) equivalente a 0,45 milimole de grupos amino, na câmara de reacção de um sintetizador de peptidos semi-automático La-bortec SP 640. Neutraliza-se a resina com Et₃N numa solução

ali:9
2 AGO 1991

1 a 10% (volume/volume) em CHCl_3 (2 x 15 ml; 5 + 15 minutos)
e lava-se repetidamente com DCM. Efectua-se então o acopla-
5 mento de Boc-Ala-OH pelo método do anidrido simétrico previ-
amente formado ; 0,540 gramas do aminoácido protegido são
dissolvidos em 3 ml de DCM, adicionando-se 2,32 ml de uma
solução a 8% (peso/volume) de DCC em DCM, com agitação com
agitador magnético, em banho de gelo, que se mantém duran-
te quinze minutos. Em seguida, filtra-se a mistura através
10 de um funil com uma placa filtrante porosa para eliminar o
DCU formado, e a solução é adicionada à câmara de reacção
do sintetizador, diluindo-se com mais 5 ml de DMF e come-
çando em seguida o ciclo automático de acoplamento e lava-
gem descrito na Tabela 2, apresentada mais adiante (ciclos
8 - 12). Realiza-se então o ensaio de Kaiser numa parte ali-
15 quota da resina; se o resultado for negativo, efectua-se a
desprotecção automática do grupo amino (ciclos 1 - 7). Para
os acoplamentos subsequentes, mais uma vez de acordo com o
protocolo referido na Tabela 2, utilizam-se os seguintes
aminoácidos pela ordem e nas quantidades referidas: Boc-
20 -DTrp-OH (0,545 gramas), Boc-DTrp-OH (0,545 gramas), Boc-
-Val-OH (0,390 gramas), Boc-DTrp-OH (0,545 gramas), Boc-tyr
(2-BrZ)-OH (0,890 gramas) e Boc-Asp(OcHx)-OH (0,560 gramas).
Depois do acoplamento final, desprotege-se o grupo amino da
extremidade N (ciclos 1 - 7) e retira-se a resina da câma-
25 ra reaccional, secando-se sobre carbonato de potássio, sob
vácuo, para se obterem 1,5 gramas de produto. Destaca-se en-
tão o peptido da resina e desprotegem-se as cadeias latera-
is com ácido fluorídrico anidro. O peptido ligado à resina
é colocado num reactor de "teflon" com 1,5 ml de anisol e
30 0,15 ml de sulfureto de dimetilo: arrefece-se depois esta
mistura a -50°C e destilam-se 15 ml de ácido fluorídrico
anidro, mantém-se a agitação com um agitador magnético, em
banho de gelo, durante sessenta minutos. Remove-se o ácido
fluorídrico com uma corrente de azoto, seca-se o produto
35 bruto sob aspiração durante, aproximadamente, duas horas,

-2 AGO. 1991

1 lava-se com éter etílico (2 x 15 ml) e extrai-se com ácido
acético a 50% (3 x 15 ml), filtrando-se através de um funil
com placa porosa para retirar a resina gasta. Dilui-se a so-
lução resultante com água e liofiliza-se para se obterem
5 0,250 gramas de produto bruto. Finalmente purifica-se o pep-
tido por cromatografia líquida em fase inversa e analisa-se
por HPLC analítica, nas condições descritas no Exemplo ante-
rior.

RT = 11,1 minutos; pureza cromatográfica $\geq 99\%$.

10 Exemplo 3

Síntese do Peptido Cíclico com a Seguinte Sequência:

Ciclo- Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Arg

Na câmara de reacção de um sintetizador manual, colocam-se 2
gramas da acima referida resina PAM (Bachem, Suíça) que pos-
sui ácido aspártico esterificado no ligador de benzilo da re-
15 sina em virtude da função beta-carboxilo do ácido (grau de
substituição: 0,35 milimole/grama). O ácido aspártico é tam-
bém protegido na função alfa-amino por Boc e na função alfa-
carboxilo sob a forma de éster de fluorenil-metilo. Após a
lavagem repetida da resina com DCM e DMF, o grupo alfa-amino
20 do ácido aspártico é desprotegido com TFA nas condições nor-
malmente utilizadas na estratégia de Boc, como se descreveu
no Exemplo anterior. Em seguida, efectua-se a síntese de a-
cordo com o protocolo de Boc usual (veja-se o Exemplo 2); uti-
lizam-se os seguintes amino-ácidos pela ordem e nas quanti-
25 dades indicadas: Boc-Arg(Tos)-OH (0,900 gramas), Boc-DTrp-
-OH (0,638 gramas), Boc-DTrp-OH (0,638 gramas), Boc-Val-OH
(0,456 gramas), Boc-DTrp-OH (0,638 gramas) e Boc-Tyr(2-Brz)-
-OH (1,038 gramas). Repete-se duas vezes cada acoplamento an-
tes de se proceder à desprotecção com TFA. Uma vez cons-
30 truído o precursor linear protegido, desprotege-se o grupo
amino da extremidade N com TFA e, em seguida, o grupo carbo-
xilo da extremidade C com PIP. Realiza-se a ciclização tra-
tando o precursor linear ligado à resina numa solução de
DMF com BOP (0,929 gramas) e DIEA (0,731 mls) durante três
35

al. 7
-2 AGO. 1991

1 horas, à temperatura ambiente. Repete-se o processo duas
vezes até que o ensaio Kaiser dê resultado negativo. Final-
mente, destaca-se o peptido ciclizado da resina e, ao mesmo
tempo, desprotegem-se as cadeias laterais com ácido fluorí-
5 drico anidro, pelo procedimento descrito no Exemplo 2, para
se obterem 0,545 gramas de produto bruto. Purifica-se o pe-
ptido por cromatografia líquida de fase inversa e analisa-
-se por HPLC analítica nas condições descritas no Exemplo
anterior.

10 $R_t = 13,1$ minutos; pureza cromatográfica $\geq 99\%$.
Além disso, são exemplos não restritivos de compostos de
acordo com a fórmula geral I que são incluídos na presente
invenção os seguintes:

15 H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Glu-NH₂, $R_t=10,5$ min;
H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Leu-NH₂, $R_t=12,2$ min;
H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, $R_t= 8,9$ min;
H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Nle-NH₂, $R_t=12,2$ min;
H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Gly-NH₂, $R_t=10,5$ min;
ciclo[AspTyrDTrpValDTrpDTrpPys], $R_t=10,8$ min;

20 em que R_t é o tempo de retenção em HPLC analítica, nas con-
dições descritas no Exemplo 1.

ACTIVIDADE BIOLÓGICA

25 A capacidade dos peptidos descritos na presente in-
venção para interactuarem com o receptor de neuroquinina A
como agonistas ou antagonistas foi avaliada num estudo
in vitro, usando uma preparação em que se determina a res-
posta biológica provocada por taquiquininas e peptidos re-
lacionados exclusivamente a partir do receptor de neuroqui-
30 nina A (receptor NK-2). Esta preparação é de uma artéria
isolada pulmonar de coelho, em que as taquiquininas provo-
cam uma contracção dependente da dose (Rovero e col., Neu-
ropeptides, 1989, 13, 263 - 270). A actividade dos peptidos
nesta preparação foi determinada usando uma concentração de
35 NKA (3 nM) que origina uma resposta equivalente a 45% do

al. 9
-2 AGO. 1987

- 1 máximo. Adicionaram-se então os peptidos abrangidos pela
presente invenção à preparação, em concentrações crescentes,
e avaliou-se a sua actividade em termos da inibição da res-
posta a NKA. A Tabela 3 subsequente indica os resultados
5 obtidos com uma concentração 10^{-6} M de cada um dos compostos
Seguem-se as Tabelas 1, 2 e 3 acima referidas:

TABELA 1

Protocolo para a Síntese Automática de Acordo com a Estraté-
gia de Fmoc

10

Ciclo	Reagente	Tempo
1	DMF	1 x 1 min
2	20 % PIP / DMF	1 x 3 min
15 3	20 % PIP / DMF	1 x 7 min
4	DCM	2 x 1 min
5	DMF	2 x 1 min
6	iPrOH	2 x 1 min
7	DMF	3 x 1 min
20 8	DCM	3 x 1 min
9	Fmoc-AA + HOBt / DMF / DCM	1 x 2 min
10	DCC 1 M DMF / DCM	1 x 90 min
11	iPrOH	1 x 1 min
12	DMF	1 x 1 min
25 13	DCM	1 x 1 min
14	Repetir duas vezes a partir do ciclo	

Volume de dissolventes : 10 - 20 ml/grama de resina.

30

TABELA 2

Protocolo para a Síntese Automática de Acordo com a Estra-
tégia de Boc

35

63.732

Case 44.717

al. 8
-2º AGO 1991

1	Ciclo	Reagente	Tempo
	1	DCM	1 x 1 min
5	2	50 % TFA/DCM	1 x 5 min
	3	50 % TFA/DCM	1 x 15 min
	4	DCM	3 x 1 min
	5	5 % DIEA/DCM	2 x 1 min
	6	DCM	2 x 1 min
	7	DMF	2 x 1 min
10	8	Anidrido Boc-AA em DCM/DMF	1 x 60 min
	9	DMF	1 x 1 min
	10	DCM	1 x 1 min
	11	Repetir os ciclos 8 e 9	
15	12	DCM	3 x 1 min

Volume de dissolventes : 10 - 20 ml/g de resina.

TABELA 3

20 Actividade Biológica Antagonista sobre o Receptor de NK- 2 em Artéria Pulmonar de Coelho Isolada dos Péptidos Descritos

	Péptido	% de inibição
	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Lys-NH ₂	100
25	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp- DTrp-Ala-NH ₂	100
	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Orn-NH ₂	100
	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Glu-NH ₂	100
	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Leu-NH ₂	100
	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Nle-NH ₂	100
30	H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Gly-NH ₂	100
	Ciclo [AspTyrDTrpValDTrpDTrpLys]	95
	Ciclo [AspTyrDTrpValDTrpDTrpArg]	95

Lista das Abreviaturas Utilizadas

35 Para a nomenclatura e abreviaturas dos aminoácidos, utili-

al. g.
-2. AGO. 1991

1 zam-se as recomendações da comissão conjunta IUPAC-IUB so-
bre Nomenclatura Bioquímica (Eur. J.Biochem., 1984, 138, 9)
os aminoácidos estão na configuração L, a não ser que se
indique outra configuração.

5 As outras abreviaturas utilizadas são:
2-Br-Z: 2-bromobenziloxi-carbonilo; AAA : análise de amino-
ácidos (no peptido hidrolisado); Boc : tércio-butiloxi-car-
bonilo; BPh: hexafluorofosfato de benzotriazolil-N-oxi-tris-
10 -dimetilaminofosfónio; Bzl: benzilo; DCC: N,N'-diciclo-hexil-
-carbodiimida; DCM: diclorometano; DCU: N,N'-diciclo-hexil-
-ureia; DIEA: di-isopropil-etilamina; DMF: N,N-dimetil-for-
mamida; Et₃N: trietilamina; FAB-MS: espectrometria de ma-
ssas por bombardeamento atómico rápido; Fmoc: 9-fluorenil-
-metóxi-carbonilo; HOBT: 1-hidróxi-benzotriazol; HPLC: cro-
15 matografia líquida sob alta pressão; iPrOH; isopropanol MBHA
4-metil-benzidrihmina; NKA: neuroquinina A; NKB: neuroquini-
na B; OcHx: éster de ciclo-hexilo; PIP: piperidina; SP: su-
bstância P; tBu: terció butilo; TFA: ácido trifluor-acético;
ToS ; tosilo (4-tolueno-sulfonilo).

-R E I V I N D I C A Ç Õ E S-

25 1ª-Processo para a preparação de péptidos sintéticos
lineares ou cíclicos com a fórmula geral I

X-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Y

caracterizado por:

30 -a síntese se efectuar em fase sólida com o prolongamento da
cadeia do peptido a partir da extremidade C em direcção à ex-
tremidade N num suporte polimérico insolúvel;

35 -se fazer reagir o aminoácido subsequente, apropriadamente
protegido tanto na função alfa-amina como na cadeia lateral
sob a forma activada, com o aminoácido da extremidade C ,
apropriadamente protegido na cadeia lateral e fixado ao su-
porte de polímero por intermédio da função carboxilo, no

al. 8
-2 AGO. 1991

1 seio de dissolventes orgânicos polares;
- se efectuar os acoplamentos seguintes usando o aminoácido
apropriado, adequadamente protegido, igualmente sob a forma
activada, procedendo da mesma maneira;
5 e
-se destacar então o péptido.

2ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracte-
terizado por se preparar um peptido linear, se destacar o
peptido do suporte e se desproteger apropriadamente.

10 3ª- processo de acordo com a reivindicação 1, caracte-
terizado por se preparar um peptido cíclico, se destacar o
peptido do suporte num meio apropriado e, em seguida, se
ciclizar usando agentes de activação e de condensação apro-
priados e, em seguida, se removerem apropriadamente os gru-
15 pos de protecção.

4ª- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracte-
terizado por para se obterem peptidos que contêm pelo menos
um aminoácido com dois resíduos carboxílicos, quando o resí-
duo carboxílico não está na posição alfa mas está ligado à
20 resina, se desproteger o carboxilo na posição alfa e depois
se ciclizar usando os agentes de activação e de condensação
apropriados e depois se destacar o peptido do suporte e se
removerem os grupos de protecção.

5ª- processo de acordo com a reivindicação 4 caracte-
25 terizado por se preparar um heptapeptido sintético com a se-
guinte estrutura

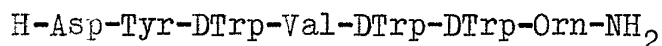
H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-L1s-NH₂
e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou
bases orgânicos e inorgânicos.

30 6ª- processo de acordo com a reivindicação 1 caracte-
terizado por se preparar um heptapeptido sintético preparar
um com a seguinte estrutura

H-Asp-Tyr-DTrp-Val-DTrp-DTrp-Ala-NH₂
e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou
35 bases orgânicos e inorgânicos

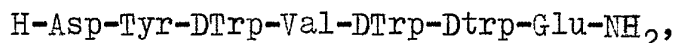
al. 7
-2 AGO. 1991

1 7ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido sintético com a seguinte estrutura



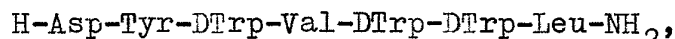
5 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

8ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido sintético com a seguinte estrutura



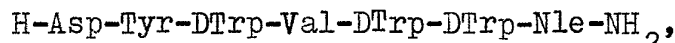
10 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

9ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um heptapeptido sintético com a seguinte estrutura



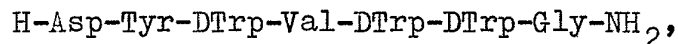
15 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

10ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido sintético com a seguinte estrutura



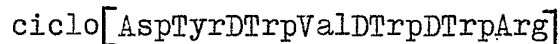
20 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

11ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido sintético com a seguinte fórmula de estrutura



25 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

12ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido cíclico sintético com a seguinte estrutura



35 e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou

1 bases orgânicos e inorgânicos.

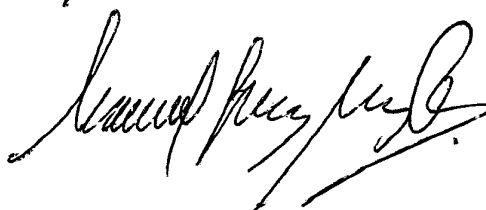
13^a- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se preparar um heptapeptido cíclico sintético com a seguinte estrutura

5 ciclo [AspTyrDTrpValDTrpDTrpLys]
e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis com ácidos ou bases orgânicos e inorgânicos.

10 14^a- Processo para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento da asma, inflamação ou artrite caracterizado por se incorporar como composto activo um peptido preparado de acordo com as reivindicações anteriores.

Declara que entrelinhou na página 4 a palavra "A Bodanszky"
Lisboa, -2 AGO. 1991

15 Por A. MENARINI
O AGENTE OFICIAL

20 

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

30

35