

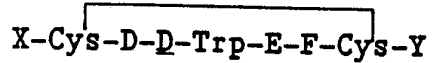
91.384

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

Estes compostos tem actividade do tipo somatostatina e compreendem um análogo peptídico da somatostatina ligado a uma âncora catiónica.

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de compostos com a fórmula



(I)

=====

SYNTEX (U.S.A.) INC.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACEUTICOS QUE  
COMPREENDEM UM ANALOGO PEPTIDICO DA SOMATOSTATINA"

onde, X é uma âncora do extremo-N

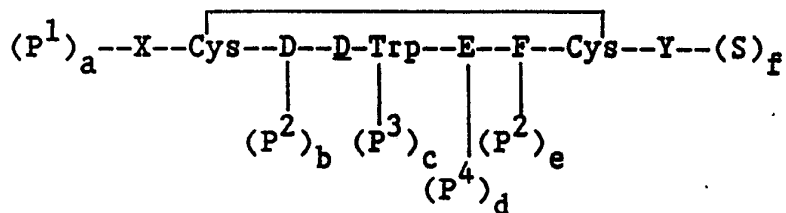
Y é uma âncora do extremo-C, G-I ou álcool G-I; em que pelo menos um de X é uma âncora cariônica;

D é Fen, Tir, pF-Fen, pCl-Fen;

E é Lis ou Lis ( $R_1$ ) onde  $R_1$  é um alquilo inferior ou fluoroalquilo com 1 a 8 átomos de carbono;

F é Tre, Val, Ser.

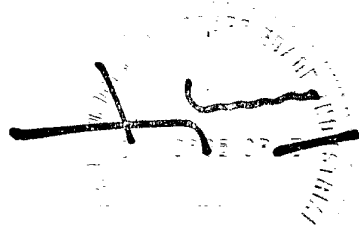
Os referidos compostos podem ser obtidos por exemplo por remoção de grupos de um composto da fórmula



onde X, Y, D, E e F são como definidos atrás;

$P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são grupos protectores onde  $R^1$  é um protector de  $\alpha$ -amina,  $P^2$  é um grupo protector de hidroxilo,  $P^3$  é um grupo  $N^{IN}$ -protector e  $P^4$  é um grupo protector de  $\epsilon$ -amina;

S é um grupo protector de carboxilo; e a, b, c, d, e, e f são números inteiros iguais a 0 ou 1, desde que todos de a a f não sejam 0.

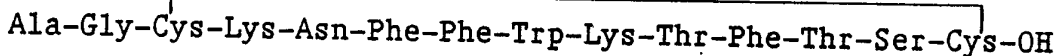


CAMPO DO INVENTO

Este invento está relacionado com compostos farmacêuticos que apresentam actividade do tipo somatostatina, com o método de preparação de tais compostos e sua utilização na regulação da secreção de hormonas no corpo. Em particular, os compostos farmacêuticos são análogos da somatostatina compreendendo um âncora cationica ligada a um peptídeo ciclico do tipo somatostatina.

FUNDAMENTO DO INVENTO

A somatostatina é um composto natural da fórmula:



Sabe-se que a somatostatina tem poderosos efeitos biológicos como hormona inibidora em muitos tecidos. Por exemplo, a somatostatina bloqueia a secreção da hormona de crescimento pela pituitária, a secreção de ácido gástrico e pepsina pela parede interior do estômago e libertação de glucagon e insulina pelos ilhéus pancreáticos. A somatostatina também actua para inibir a absorção de glucose, aminoácidos e gordura pelo tracto gastrointestinal (GI) assim como inibe a motilidade de GI.

Devido à somatostatina natural ter uma duração de acção muito curta no corpo, tem sido feitas tentativas para criar compostos com actuação prolongada e mais potentes do que a somatostatina mantendo ao mesmo tempo as características da somatostatina, i.e. compostos do "tipo somatostatina". Modificações da sequência de aminoácidos de somatostatina resultou nalguns casos num aumento de potência, duração de acção, especificada relativa e outras características desejáveis.

Compostos "tipo somatostatina" para usar como inibidores da secreção da hormona de crescimento estão descritos na Patente U.S. Nº 4 291 022 saída em 22 de Setembro de 1981. Os compostos são derivados da somatostatina natural.

Análogos da somatostatina compreendendo um hexapeptídeo acíclico no qual sete dos aminoácidos do anel da somatostatina foram eliminados estão descritos na Patente U.S. Nº 4 310 518 publicada em 13 de Janeiro de 1982. Os compostos inibem a libertação de hormona de crescimento, insulina e glucagon.

Hexapeptídeos cíclicos e somatostatina cíclica composto para usar no tratamento de hipersensibilidade imediata estão divulgados no Pedido de Patente Europeia 0 222 578, atribuída à Merck & Co. Inc. Antilização de análogos da somatostatina no tratamento de doenças dermatológicas está descrito no Pedido de Patente Europeia 0 175 644 atribuído à Sandoz AG.

Cai, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1896 (1986) descreve um análogo octapeptídico da somatostatina que apresenta duração de acção prolongada na inibição da libertação da hormona de crescimento comparada com a somatostatina. Também foram apresentados mostrando alguma inibição do crescimento de tumores.

Bauer et al., Life Sciences 31: 1133 (1982) descreve análogos específicos da somatostatina apresentando acção prolongada e um aumento de três vezes na potência relativamente à somatostatina na inibição de secreção da hormona de crescimento. Os octapeptídeos descritos foram especificamente modificados nos resíduos de cisteína da molécula e verificou-se terem particular importância no tratamento de acromegalia.

A patente dos Estados Unidos Nº 4 342 671 publicada em 3 de Agosto de 1982 descreve análogos da somatostatina com modificações selectivas em certas posições dentro do peptídeo. Os análogos da somatostatina modificados mostraram ter a mesma actividade da molécula nativa.

Kurashima, et al., Life Sciences 41: 1011 (1987) descreve os efeitos de análogos octapeptídicos da somatostatina altamente potentes relativamente à libertação de hormona de crescimento, insulina e glucagon.

Redding e Schally, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1078 (1983) descreve a utilização de análogos da somatostatina na inibição do crescimento de condrosarcoma transplantável de rato.

Moreau et al., Life Sciences 40: 419 (1987) proporcionou uma mini-revisão recente do trabalho que está a ser conduzido na área da somatostatina e de análogos da somatostatina. Foram discutidos os avanços terapêuticos e estudos farmacológicos a decorrer.

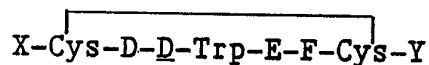
No presente invento, a adição de uma âncora cationica provocou um aumento da duração de acção e aumentou grandemente a especificidade da acção. A âncora cationica do presente invento é da classe de N<sup>W</sup>alquil-aminoácido básico, natural e não natural. O uso de aminoácidos não naturais da classe de N<sup>W</sup> alquil-aminoácidos incorporados nos

análogos antagónicos da hormona de libertação da hormona luteinizante (LH-RH) como meio de estabilizar uma hipotética interacção de fosfolípidos de membrana foi recentemente descrito, Nestor, et al., J. Med. Chem. 31: 65 (1988). No entanto, a incorporação da âncora catiónica numa estrutura análoga da somatostatina foi já anteriormente descrita. Existe evidência científica que sugere a especificidade da interacção ligando-receptor como podendo envolver a interacção do ligando e fosfolípidos da membrana. (Schwyzzer, Biochemistry 25: 6335 (1986)). A adição de âncoras catiónicas aqui descrita para os peptídeos cíclicos do tipo somatostatina resultou numa potência, duração de acção e selectividade de acção muito maiores.

#### SUMÁRIO DO INVENTO

O aspecto chave dos compostos deste invento é a combinação de uma âncora catiónica ligada a um peptídeo cíclico tipo somatostatina, directamente ou através de um espaçador. Como resultado da ligação da âncora catiónica, os compostos do invento apresentam maior actividade, duração de acção e especificidade.

Uma realização do invento é um composto da fórmula



(I)

e seus sais farmacêuticamente aceitáveis onde,

X é uma âncora do extremo N;

Y é uma âncora do extremo C, G-I ou álcool de GI; onde pelo menos um dos X e Y é uma âncora catiónica;

D é Fen, Tir, pF-Fem, pCl-Fen;

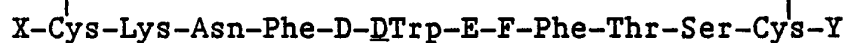
E é Lis ou Lis(R<sub>1</sub>) onde R<sub>1</sub> é um alquilo inferior ou fluoroalquilo com 1 a 8 átomos de carbono;

F é Tre, Val, Ser;

G é a configuração D ou L de Tre, Fen ou Nal(2); e

I é -OH, -NHR<sub>2</sub> onde R<sub>2</sub> é H ou um substituinte seleccionado entre R<sub>1</sub> atrás.

Uma outra realização do invento é um composto tipo somatostatina da fórmula:



(II)

e seus sais farmacêuticamente aceitáveis onde,

X é uma âncora do extremo N;

Y é uma âncora do extremo C, G-I ou álcool de G-I; em que pelo menos um dos X e Y é uma âncora catiónica;

D é Fen, Tir, pF-Ten, pCl-Fen;

E é Lis ou Lis(R<sub>1</sub>) onde R<sub>1</sub> é um alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

F é Tre, Val, Ser;

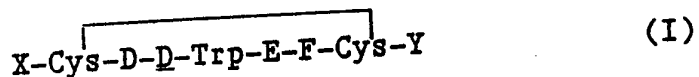
G é a configuração D ou L de Thr, Fen, Nal(2), ou (Gli)<sub>m</sub>

e m é 0 a 3; e

I é -OH, -NHR<sub>2</sub> onde R<sub>2</sub> é H ou um substituinte seleccionado entre R<sub>1</sub> atrás.

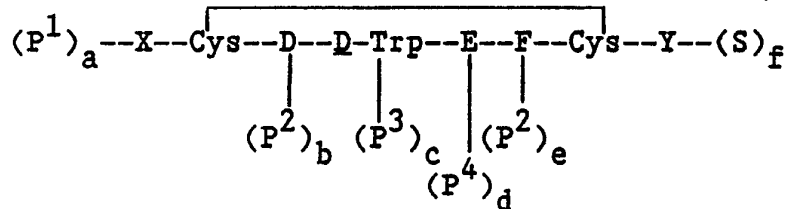
Ainda numa outra realização do invento é descrito um método para a preparação dos compostos do invento e seus sais farmacêuticamente aceitáveis. O método caracterizado pela remoção de grupos protectores e, facultativamente, suporte sólido covalentemente ligado de um polipeptídeo protegido para dar um composto, em que o composto compreende: (a) um peptídeo cíclico tendo actividade tipo somatostatina e (b) uma âncora catiónica ligada a um ou a ambos os resíduos cisteína do peptídeo.

Em particular, os métodos para a preparação de um composto da fórmula:



e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, onde X, Y, D, E e F são como definidos atrás; caracterizam-se por:

(a) remoção de grupos protectores de um composto da fórmula:



onde,

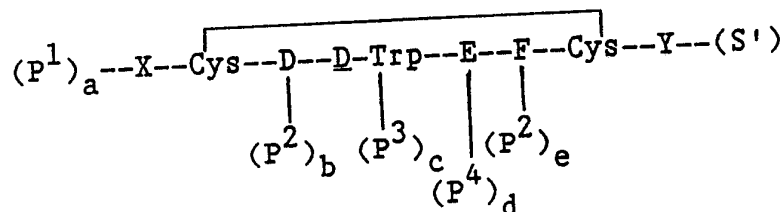
X, Y, D, E e F são como definidos atrás:

$P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são grupos protectores em que  $P^1$  é um grupo protector de  $\alpha$ -amino,  $P^2$  é um grupo protector de hidroxilos,  $P^3$  é um grupo  $N^{IN}$ -protector e  $P^4$  é um grupo protector de  $\xi$ -amino.

S é um grupo protector de carboxilo; e

a, b, c, d, e e f é cada um, um número inteiro igual a 0 ou 1, desde que todos de a a f não sejam 0; ou

(b) remoção simultânea dos grupos protectores e de um suporte polimérico de um composto da fórmula:



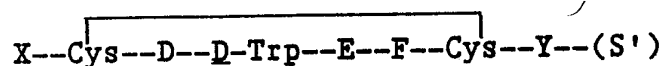
onde,

X, Y, D, E, F, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> e P<sup>4</sup> são como definidos no parágrafo (a) atrás;

cada a, b, c, d e e é um inteiro igual a 0 ou 1, desde que todos de a a e não sejam 0; e

S' é um suporte polimérico;

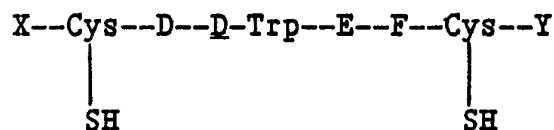
(c) remoção de um suporte polimérico de um composto da fórmula:



em que,

X, Y, D, E, F, e S' são como definidos no parágrafo (b) atrás; ou

(d) oxidação de um composto da fórmula:



em que

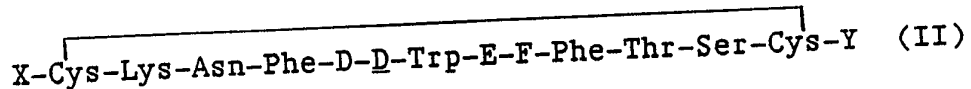
X, Y, D, E e F são como definidos no parágrafo (a) atrás; ou

(d) conversão de um composto da fórmula I num seu sal farmacêuticamente aceitável; ou

(e) conversão de um sal do composto da fórmula I num outro sal farmacêuticamente aceitável; ou

(f) conversão de um sal do composto de fórmula I no peptídeo livre; e

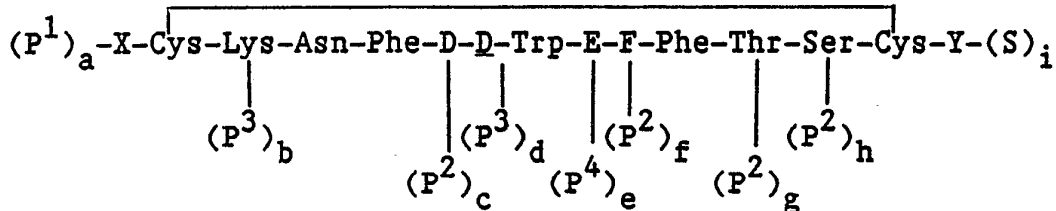
os métodos para a preparação de um composto da fórmula:



onde

X, Y, D, E e F são como definidos atrás e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado por

(a) remoção de grupos protectores de um composto de fórmula:



onde,

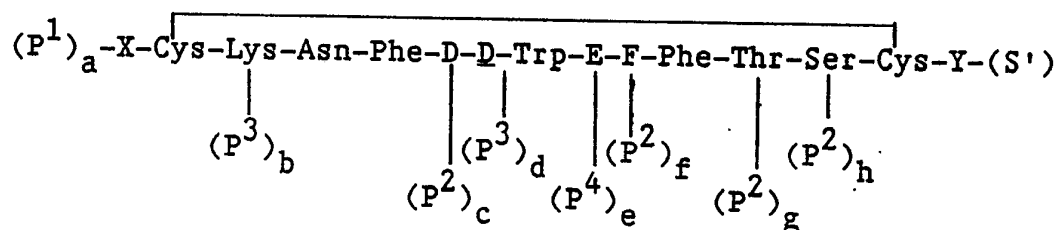
X, Y, D, E e F são como definidos atrás

$P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são grupos protectores em que  $P^1$  é um grupo protector de  $\alpha$ -amino,  $P^2$  é um grupo protector de hidroxilo,  $P^3$  é um grupo  $N^{IN}$ -protector e  $P^4$  é um grupo protector de  $\xi$ -amino;

S é um grupo protector de carboxilo; e

cada um de a, b, c, d, e, f, g, h e i é um inteiro igual a 0 ou 1, desde que todos de a a i não sejam 0; ou

(b) remoção simultânea dos grupos protectores e do suporte polimérico de um composto da fórmula:



onde;

X, Y, D, E, F,  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são como definidos no parágrafo (a) atrás;

cada um de a, b, c, d, e, f, g e h é um inteiro igual a 0 ou 1, desde que todos de a a h não sejam 0; e

S' é um suporte polimérico;

ou

(c) remoção de um suporte polimérico de um composto da fórmula:



Ainda numa outra realização do invento é descrito uma composição para o tratamento eficaz de um indivíduo em que a composição farmacêutica compreende uma quantidade eficaz de um composto do invento, facultativamente com um veículo farmacêutico reconhecido.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

#### Abreviaturas e definições

Conforme estabelecido atrás e por conveniência na descrição deste invento, as abreviaturas convencionais para os vários aminoácidos comuns são usadas conforme geralmente aceites e recomendado pela IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Biochem J. 219: 345 (1984). Todas as sequências peptídicas aqui referidas foram escritas de acordo com a convenção de um modo geral aceite pelo que o aminoácido N-terminal está à esquerda e o aminoácido C-terminal está à direita.

As abreviaturas aqui representadas são de L-aminoácidos a menos que sejam designados como D- ou D,L-. Certos aminoácidos tanto naturais como não naturais são oquirálicos, e.g. glicina.

Os aminoácidos não naturais são designados como o aminoácido apropriado com o substituinte entre parentesis. Por exemplo,

Lis( $R_1$ ) é lisina com um substituinte  $R_1$  na  $\omega$ -amina e Arg( $R_1, R_2$ ) e hArh( $R_1, R_2$ ) são arginina e homo-arginina,

respectivamente, com um substituínte  $R_1$  no  $\omega$ -azoto e um substituínte  $R_2$  no  $\omega'$ -azoto da fracção guanidino.

Abreviaturas específicas de aminoácidos não naturais serão úteis na descrição do invento. Aminoácidos não naturais representativos que podem ser empregues incluem os seguintes:

<u>Resíduo de aminoácido</u>	<u>Abreviatura</u>
3-(2-naftil)-alanilo	Nal(2)
3-(p-fluorofenil)-alanilo	pF-Fen
3-(p-clorofenil)-alanilo	pCl-Fen
*N,N'-guanidino-dimetil-homoarginilo	Dmh ou hArg (Me) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(dietil)-homoarginilo	Deh ou hArg (Et) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(diisopropil)- -homoarginilo	Dih ou Arg (oPr) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(dipropil)- -homoarginilo	Dph, ou hArg(Pr) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(di-hexil)-homoarginilo	Dhh ou hArg(hexil) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(etano)- -homoarginilo	Eha ou hArg(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(propano)- -homoarginilo	Pha ou hArg(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>
*N,N'-guanidino-bis-(2,2,2- -trifluoroetil)-homoarginilo	Bth ou hArg(CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(etil)-homoarginilo	Meh ou hArg(Et)
*N-guanidino-(propil)-homoarginilo	Prh ou hArg(Pr)
*N-guanidino-(isopropil)-homoarginilo	Iph ou hArg(iPr)
*N-guanidino-(butil)-homoarginilo	Mbh, ou hArg(Ba)

*N,N'-guanidino-(diciclo-hexil)- -homoarginilo	Dch ou hArg(ciclohexil) <sub>2</sub>
*N-guanidino-(heptil)-homoarginilo	Hha ou hArg(heptil)
*N-guanidino-(etil)-arginilo	Mea ou Arg (Et)
*N-guanidino-(hexil,metil)-arginilo	Hmh ou hArg(hexil,metil)
*N-guanidino-(butil,metil)-arginilo	Bmh ou hArg(butil,metil)
*N $\epsilon$ -isopropil-lisina	Ipl ou lis(iPr)
*N,N'-guanidino-(diisopropil)-arginilo	Dia ou Arg (iPr) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-(diciclo-hexil)-arginilo	Dca ou Arg(ciclo- -hexil) <sub>2</sub>
*N,N'-guanidino-bis(3,3,3,2,2- -pentafluoropropil)homoarginilo	Bph
*N,N'-guanidino-(3,3,3,3,3- -pentafluoropropil)homoarginilo	Fph
*N <sup>G</sup> -etil,N <sup>G'</sup> -(2,2,2-trifluoroetil)- -homoarginilo	Efh
*N,N'-guanidino-(dietil)arginil	Dea
*N,N'-guanidino-bis(2,2,2- -trifluoroetil)-arginilo	Bta

Os asteriscos nos aminoácidos não naturais podem funcionar como âncoras catiónicas de acordo com este invento.

Os aminoácidos não naturais aqui descritos foram preparados por métodos bem conhecidos e podem ser usados em solução processos de síntese peptídica em solução ou em fase sólida (Ver, por exemplo, Nestor, et al., supra (1988)).

Conforme aqui é usado o termo "sais farmacêuticamente aceitáveis" refere-se a sais que mantêm a actividade biológica pretendida do composto parental e não conferem quaisquer efeitos tóxicos indesejáveis. São exemplos de tais sais (a), sais de adição ácida formados com ácidos inorgânicos, por exemplo ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e similares; e sais formados com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleíco, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido pâmico, ácido tânico, ácido alginico, ácido poliglutânico, ácidos naftalenossulfónicos, ácidos naftalenodissulfónicos, ácido poligalacturónico; (b) sais de base formados com catiões metálicos polivalentes tais como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio e similares; ou com um catião orgânico formado a partir de N,N-dibenziletieno-diamina ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e (b), e.g. um sal tanato de zinco e similares.

O termo "alquilo" refere-se a um radical hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada tendo entre 1 e 8 átomos de carbono. Exemplos de tais grupos alquilo com a correspondente abreviatura incluída entre parentesis, incluem mas não estão limitados a metilo (Me), etil (Et), n-propilo (Pr), inopropilo (iPr), n-butilo (Bu), isobutilo (iBu), sec-butilo (s-Bu), terc-butilo (t-Bu), n-pentilo (Pe), n-hexilo (He) ou radicais ramificados com 5 a 8 átomos de carbono e similares.

Fluoroalquilo refere-se a alquilo inferior substituído com 1 a 5 átomos de fluor, por exemplo  $\text{CF}_3\text{CH}_2-$ ,  $\text{CF}_3-$ ,  $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CH}_2-$ , e similares.

A abreviatura "N-Ac" refere-se especificamente ao grupo protector N-acetilo, i.e., um grupo

acetilo ligado a um residuo de aminoácido terminal no azoto de amina, em conformidade com a nomenclatura geralmente aceite.

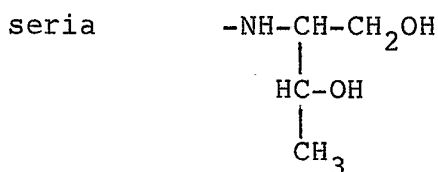
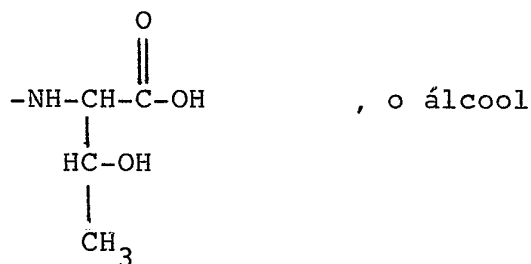
Acilo refere-se ao radical orgânico derivado de um ácido orgânico pela remoção do grupo hidroxilo. De um modo geral, o acilo é ligado a um residuo de aminoácido terminal no azoto de amina.

Uma âncora refere-se a uma fracção de aminoácido cobalentemente ligada e biologicamente aceitável que está ligada a um dos grupos Cis descrito nos compostos da fórmula I e II. As fracções de aminoácidos derivam de aminoácidos naturais, tais como alamina, arginina, asporagidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalamina, prolina, serina, treonina, triptofano, tironina, valina e similares e aminoácidos não naturais, tais como homocisteira, ornitina, homoarginina,  $\beta$ -alanina, os aminoácidos não naturais referidos atrás e similares. Uma âncora catiónica terá uma função com carga positiva e.g. da classe de  $N^W$ alquil-aminoácidos básicos, os quais podem ser ligados ao peptideo directamente ou através de um espaçador. Exemplos de  $N^W$ alquil-aminoácidos básicos incluem arginina, homoarginina, lisina, ornitina e os aminoácidos não naturais com asteriscos referidos atrás, Quando a âncora catiónica é ligada ao extremo N, um residuo de aminoácido tipo Tre, um residuo aminoácido hidrofóbico ou uma outra âncora catiónica podem ser ligados ao extremo C. Exemplos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos incluem glicina, alamina, valina, leucina, osileucina, triptofano, fenilalamina, naftiladamina, fenilalanina, halo-substituida e similares. Quando a âncora catiónica está ligada ao extremo C, um residuo hidrofóbico ou uma outra âncora catiónica podem ser ligados ao extremo N.

Um peptideo cíclico tipo somatostatina é uma fracção peptídica cíclica tendo actividade de ligação ao receptor da somatostatina ou com actividade biológica

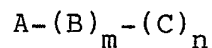
tipo somatostatina.

Um álcool de G-I refere-se ao álcool derivado da fracção de aminoácido que G-I representa, Por exemplo, se G-I fôr Tre-OH, i.e.



Realizações preferidas

Uma das realizações preferidas do invento é um composto da fórmula I ou II em que X é uma âncora catiónica da fórmula geral:



onde A é acilo ou H;

B é hArg(R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>), Arg(R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>) ou Lys(R<sub>1</sub>), onde R<sub>1</sub> é alquilo inferior ou fluoroalquilo com 1 a 8 átomos de carbono e R<sub>2</sub> é H ou um substituinte seleccionado entre R<sub>1</sub> ou outros w-alquil-aminoácidos básicos;

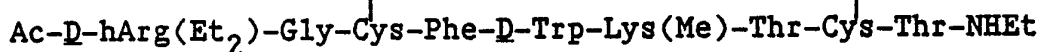
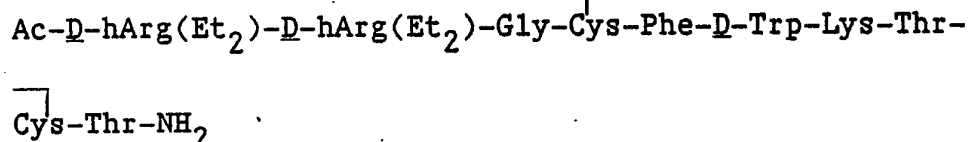
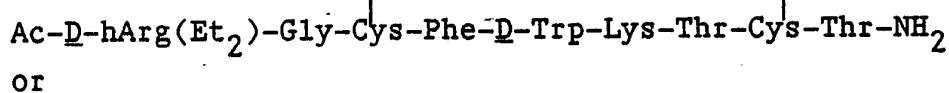
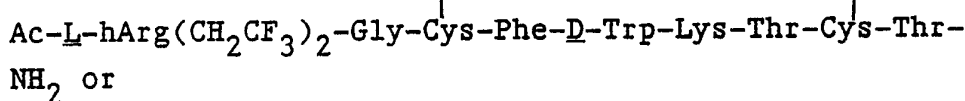
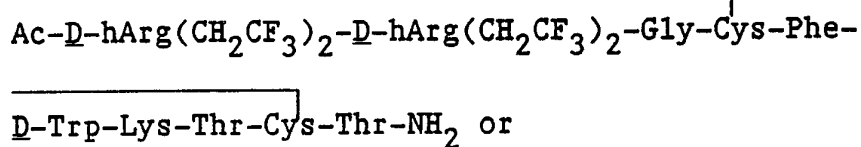
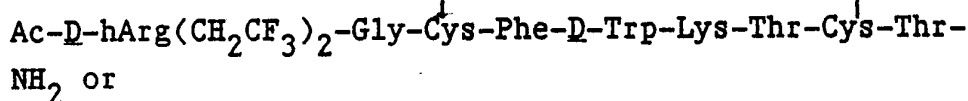
m é um inteiro de 1 a 3;

C é um espaçador tal como Cli, Ala, B-Ala; e

n é um inteiro de 0 a 5

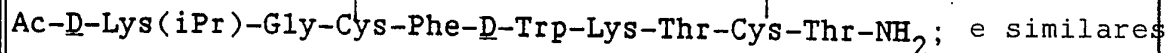
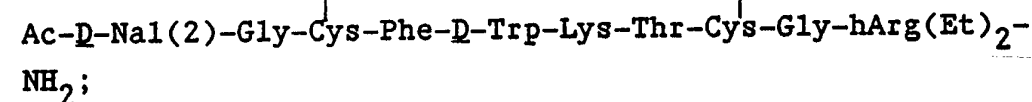
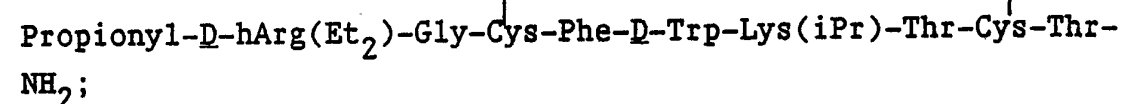
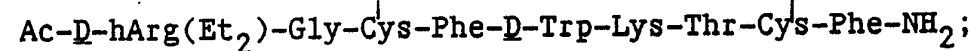
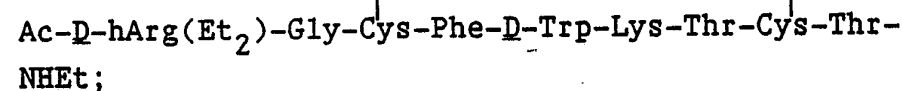
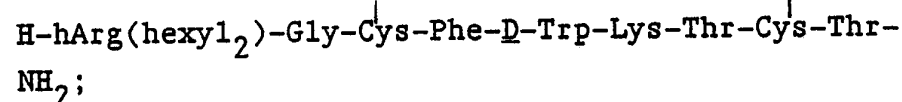
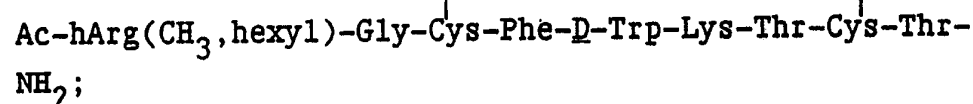
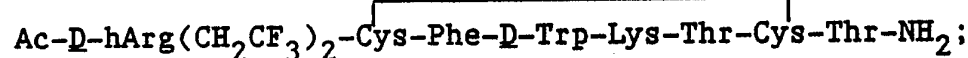
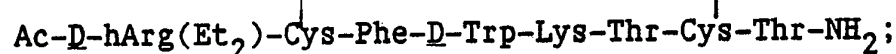
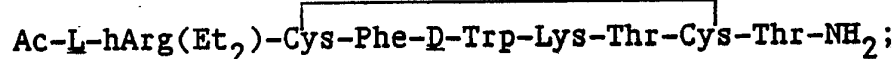
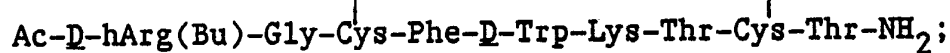
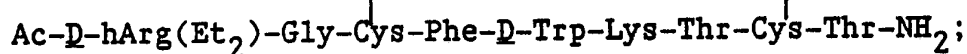
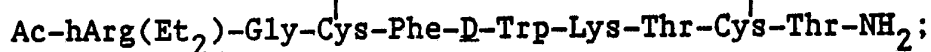
São compostos particularmente úteis aqueles em que n é 0 ou 1.

O peptídeo cíclico tipo somatostatina com a sua âncora catiónica ligada pode ser todo o anel do dodecapeptídeo ou o hexapeptídeo cíclico e seus análogos com substituições no anel. Numa realização prática mais preferida do invento, o composto

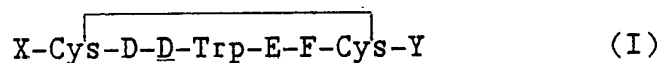


e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

Outros compostos preferidos do invento incluem:



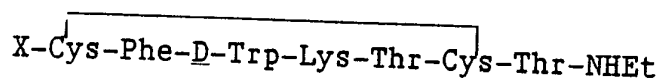
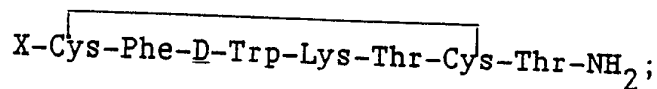
De um modo mais geral, os compostos do presente invento em que o peptídeo é um hexapeptídeo cíclico têm a fórmula:

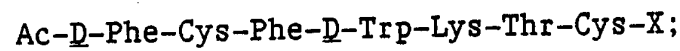
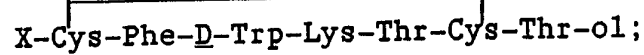
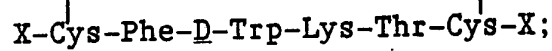


e seus sais farmacêuticamente aceitáveis em que,

- X é uma âncora do extremo N;
- Y é uma âncora do extremo C, G-I ou álcool de G-I, e.g. G-I é Tre, treoninol, fenilelaminol e similares; onde pelo menos um de X e Y é uma âncora catiónica;
- D é Fen, Tir, pF-Fen, pCl-Fen;
- E é Lis ou Lis ( $R_1$ ) onde  $R_1$  é um alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono, especialmente Lis ou Lis (Me);
- F é Tre, Val, Ser;
- G é a configuração D ou L de Tre, Fen ou Nal(2); e
- I é -OH, -NHR<sub>2</sub> onde R<sub>2</sub> é H cu substituinte selecionado de entre R<sub>1</sub> atrás.

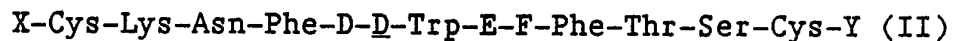
Outros exemplos mais genéricos dos compostos da fórmula I, os quais estão incluídos como parte deste invento são os hexapeptídeos cíclicos ligados à âncora catiónica do invento, incluindo suas versões substituídas, e.g.,





e similares,, onde X é a âncora catiónica.

Os compostos também incluídos dentro do âmbito deste invento são os compostos da fórmula (II), como se segue:



e seus sais farmacêuticamente aceitáveis em que

X é uma âncora do extremo N;

Y é uma âncora do extremo C, G-I ou álcool de

G-I onde pelo menos um de X e Y é uma âncora

catiônica;

D é Fen, Tir, pF-Fen, pCl-Fen;

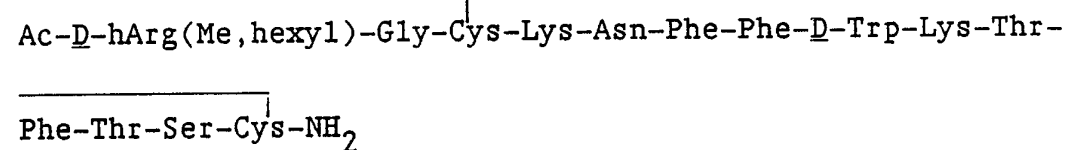
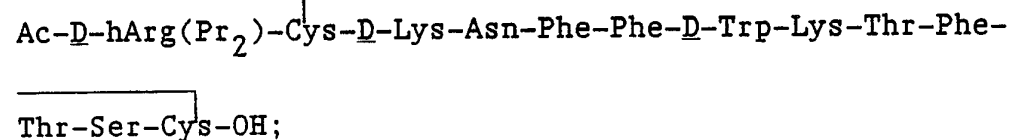
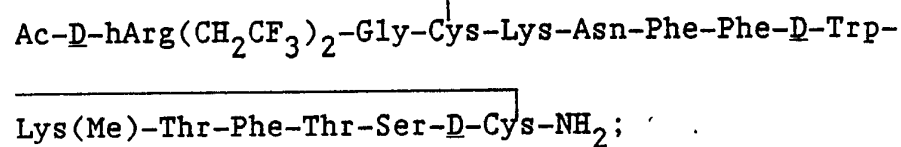
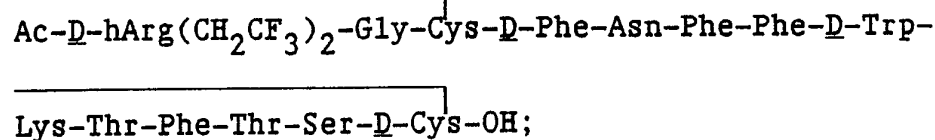
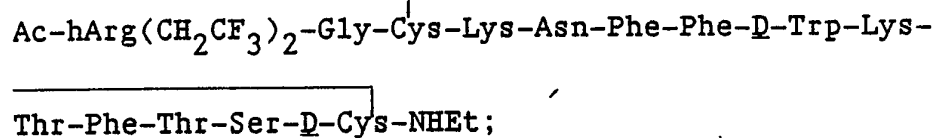
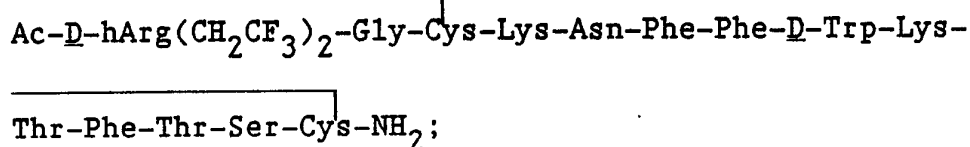
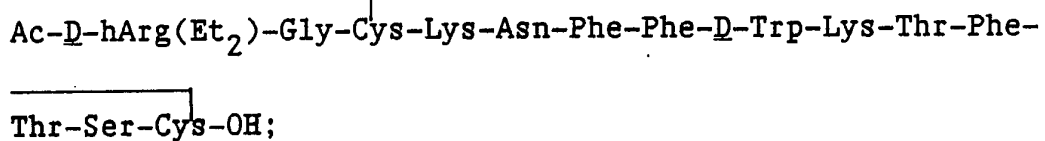
E é Lis ou Lis ( $R_1$ ) onde  $R_1$  é um alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

F é Tre, Val, Ser;

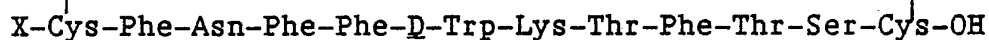
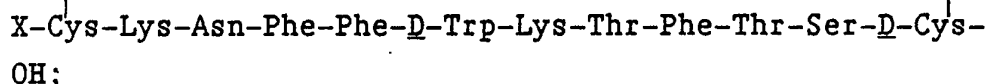
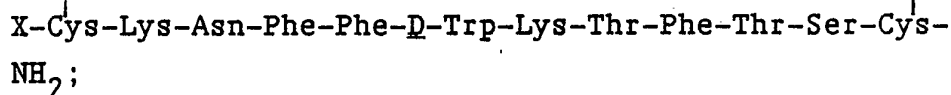
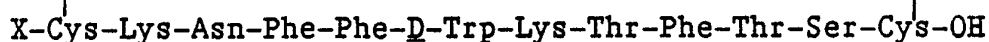
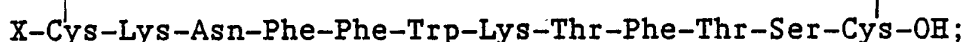
G é a configuração D ou L de Tre, Fen, Nal (2) ou  $(\text{Gli})_m$ , e m é 0 a 3; e

I é -OH, -NHR<sub>2</sub> onde R<sub>2</sub> é H ou um substituinte seleccionado entre R<sub>1</sub> atrás.

Exemplos dos análogos tipo somatostatina da fórmula II derivados da somatostatina (dodecapeptídeo cíclico) ligado à âncora catiónica deste invento incluem os seguintes:



De um modo geral, o peptídeo ciclíco tipo somatostatina pode ser todo o anel dodecapeptídico da somatostatina ou os seus análogos substituídos no anel ligados à âncora catiónica do invento, por exemplo,



e similares, onde X é a âncora catiónica.

Muitos análogos com substituições dentro do anel são conhecidos e englobados no âmbito destas divulgações quando é incluída a "âncora catiónica" definida atrás. Os compostos deste invento também incluem o correspondente anel reduzido (i.e. forma dissulfidrílo).

Conforme discutido foram descritos substituições dentro dos fragmentos cíclicos dodecapeptídicos e hexapeptídicos como dando análogos activos. Análogos tipo somatostatina tendo tais substituições foram combinados com as âncoras catiónicas aqui descritas para dar análogos com potência e selectividade biológica inesperadamente superiores.

As modificações aqui descritas têm aplicação em todas as classes conhecidas de análogos tipo somatostatina. Os resultados sugerem que a âncora catiónica do presente invento actue para facilitar a acção biológica do peptídeo. Esta divulgação inclui portanto não só os análogos especificamente referidos, mas também todos os análogos da somatostatina tendo a âncora catiónica descrita no análogo peptídico.

Em todas as realizações descritas atrás, o composto pode ser também preparado como um correspondente sal farmacêuticamente aceitável.

#### Utilidade e processos de ensaio

Os compostos deste invento são surpreendentemente potentes e de longa duração, apresentando potência muito elevada para inibição da secreção da hormona de crescimento relativamente à inibição da secreção da insulina ou glucagon. Em particular, os compostos maiores, i.e. peptídeos maiores do que hexapeptídeos, apresentam maior inibição da secreção ácida gástrica.

Uma medida primária de actividade de somatostatina é a capacidade para moderar a produção de insulina, hormona de crescimento e/ou produção de glucagon no corpo.

Os bioensaios usados na determinação do efeito da somatostatina sobre a regulação de hormonas no corpo são os conhecidos no campo e incluem por exemplo, medições da inibição da libertação de insulina induzida por

glucose, libertação de glucagon induzida pela insulina e libertação da hormona de crescimento induzida por nembutal ou clonidina. Uma descrição mais detalhada dos ensaios pode ser encontrada nos Exemplo 4, 5 e 6.

A utilização dos análogos tipo somatostatina do presente invento inclui o tratamento de doenças humanas reguladas pela somatostatina. Entre estas estão aplicações em "síndrome Carcinóide", úlceras pepticas, diabetes tipo II (diabetes não dependentes de insulina/NIDD), diarreia causada por ileostomia supressão da secreção de produtos endócrinos por "apudomas" e secreção inadequada de glucagon e hormona de crescimento em diabetes e modulação da tomada de glucose e de aminoácidos pelo tracto gastrointestinal com particular aplicação nas complicações de diabetes incluindo retinopatia, nefropatia, hipertensão e doenças das artérias coronárias.

Os compostos deste invento podem ser usados para provocar a regressão de tumores, especialmente dos tumores que expressam receptores para o factor de crescimento epidérmico (EGF), por exemplo, adenomas da pituitária, tumores do cérebro (e.g. meningioma), tumores abdominais (carcinóides), tumores endócrinos e tumores pancreáticos. (Ver Lamberts, ISI Atlas of Science, Pharmacology, pág. 179-184 (1988) e referências nele citadas).

Aplicações clínicas adicionais incluem por exemplo, doenças gastrointestinais, incluindo hemorragias do GI superior, úlceras gástricas e duodenais, gastrite provocada por "stress" e varizes esofágicas. Outras indicações incluem acromegália, pancreatite hemorrágica e fistula abdominal, cicatrização de feridas após cirurgia abdominal e alívio dos sintomas de trauma grave e "stress" devido a hiperglicémia extrema.

Os compostos deste invento apresentam um aumento na potência e duração de acção in vivo comparado com os análogos da somatostatina conhecidos. Ainda que não querendo ser vinculados a qualquer teoria ou explicação desta observação pensamos que a ligação da âncora de ligação à membrana ao peptídeo cíclico tipo somatostatina num composto tendo maior afinidade para membranas o qual pode provocar uma alteração na repartição dos análogos pelos tecidos. Tais propriedades conduzem ao depósito nas membranas fosfolípidicas do corpo permitindo assim que os análogos sejam retidos dentro do corpo durante um período de tempo maior. Põe-se a hipótese de tais modificações poderem levar também a uma maior afinidade para os receptores por facilitar a utilização dos receptores de acordo com o modelo proposto de Schwyzer, supra e referências ali presentes.

#### Administração

Na realização prática deste invento uma quantidade eficaz de um composto do invento ou uma composição farmacêutica contendo o mesmo é administrado ao indivíduo necessitado ou que pretenda tal tratamento. Estes compostos ou composições podem ser administrados por qualquer uma de uma variedade de vias dependendo do uso para um fim específico incluindo as vias oral, parentérica (incluindo administração subcutânea intramuscular e intravenosa), rectal, bucal (incluindo sublingual), transdérmica ou intranasal. Em qualquer caso a via mais adequada dependerá da utilização, do ingrediente activo particular e do sujeito envolvido. O composto ou composição pode também ser administrado por meio de libertação controlada, depósito de implantações ou formulações injectáveis como descrito aqui mais detalhadamente.

Em geral para usar como descrito no presente invento é conveniente administrar o ingrediente activo em quantidades entre cerca de 0,001 e 10,0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso de corpo, ainda mais preferido cerca de 0,01 a 5,0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso do corpo. Para a terapia em humanos, o ingrediente activo será administrado de preferência na gama de cerca de 0,01 a cerca de 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ . Esta administração pode ser conseguida por uma única administração, por distribuição por várias aplicações ou por libertação lenta de modo a conseguir-se os resultados mais eficazes. Quando administrando como monodose, a administração será preferencialmente na gama de cerca de 0,01 até cerca de 0,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A dose exacta e o regime de administração destes compostos e composições estarão necessariamente dependentes das necessidades do estado. Em geral, a administração parentérica requer dosagens mais pequenas do que outros métodos de administração os quais são mais dependentes da absorção.

Um outro aspecto do presente invento relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo como ingrediente activo um composto do presente invento misturado com um veículo não tóxico farmacêuticamente aceitável. Conforme referido atrás, tais composições podem ser preparadas para usar em administração parentérica (subcutânea, intramuscular ou intravenosa) particularmente na forma de soluções ou suspensões líquidas; para administração oral ou bucal particularmente na forma de comprimidos ou cápsulas; ou intranasalmente em particular na forma de pós e gotas nasais ou aerossóis.

As composições podem ser convenientemente administradas na forma de monodose e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bem conhecidos em farmácia, por exemplo como descrito em Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edição, Mack Publishing Company, Easton, P.A.,

1985. As formulações para administração parentérica podem conter como excipientes vulgares água estéril ou soro fisiológico, alquilenoglicóis tais como propilenoglicol, polialquilenoglicóis tais como polietilenoglicol, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados e similares. Para administração oral, a formulação pode ser melhorada pela adição de sais biliares e também pela adição de acilcarmitinas (Am. J. Physiol. 251: 332 (1986)). As formulações para administração nasal podem ser sólidas e conterem como excipientes, por exemplo, lactose ou dextrano, ou podem ser soluções aquosas ou oleosas para administração na forma de gotas nasais ou vaporizador controlado. Para administração os excipientes típicos incluem açúcares, estearato de cálcio, estearato de magnésio, amido pregelatinado e similares.

Quando formulado para administração nasal a absorção através da membrana mucosa nasal é aumentada por ácidos tensoactivos tais como por exemplo, ácido glicólico, ácido cólico, ácido taurocólico, ácido etocólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desidrocólico, ácido glicodesoxicólico e similares. (Ver, B.H. Vickery, "LHRH and Its Analogs-Contraception and Therapeutic Applications", Pt. 2, B.H. Vickery e J.J. Nestor, Eds., MTP Press, Lancaster, U.K., 1978).

Um ou mais ácidos ou sais tensoactivos, mas de preferência um único sal de ácido farmacêuticamente aceitável, pode ser adicionado aos compostos do presente invento. Sais tensoactivos farmacêuticamente aceitáveis serão os sais que mantêm o fenómeno de aumento da absorção peptídica, assim como as características tensoactivas do composto que não são prejudiciais para o individuo ou de outro modo contraindicados. Tais sais são por exemplo os sais derivados de bases inorgânicas que incluem sais de sódio, potássio lítio, amónio, cálcio, magnésio, ferroso, zinco, cobre, manganoso, alumínio, férricos, mangânicos e similares. São particularmente preferidos os sais de amónio, sódio, cálcio e mag-

nésio. Sais derivados de bases orgânicas não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis incluem sais de amins primárias, secundárias e terciárias, amins substituídas incluindo amins substituídas naturais, amins cíclicas e resinas de permuta iônica básicas tais como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trometamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaina, hidrabamina, colina, betaina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina e similares. São particularmente preferidas as bases orgânicas não tóxicas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitclohexilamina, colina e cafeína.

A quantidade de tensioactivo usada na prática deste invento será uma quantidade que aumentará a absorção dos análogos da somatostatina relativamente à de outros tensioactivos que também possam aumentar a absorção de peptídeos até um certo ponto. Encontrou-se que tal quantidade está muitas vezes na gama entre 0,2 e 15% mais vulgarmente 0,2 a 5 por cento por peso/volume da solução. É preferido que o tensioactivo esteja presente numa quantidade entre cerca de 0,5 e 4 por cento por peso volume, conveniente - mente cerca de 1 por cento por peso volume, de preferência cerca de 2 por cento por peso volume.

É desejável libertar os compostos do presente invento no individuo durante periodos de tempo prolongados, por exemplo, durante períodos de uma semana a um ano a partir de uma única administração. Podem ser utilizados várias formas de libertação lenta como implantes de depósitos de dosagens injectáveis. Por exemplo, uma forma de dosagem poderá conter um sal não tóxico farmacêuticamente aceitável do composto o qual apresenta um grau de solubilidade inferior nos fluídos de corpo, por exemplo, (a) um sal de adição ácida com um ácido polibásico como seja ácido fosfórico,

ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tânico, ácido pamóico, ácido algénico, ácido poliglutâmico, ácidos naftaleno-mono- ou di-sulfónicos, ácido poligalacturónico e similares; (b) um sal com um catião metálico polivalente tal como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio e similares ou com um catião orgânico formado a partir de e.g. N,N'-dibenziletilenodiamina ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e (b) e.g. um sal tanato de zinco. Em adição os compostos do presente invento ou, de preferência, um sal relativamente insolúvel como os descritos atrás, pode ser formulado num gel, por exemplo, um gel de monoestearato de alumínio com, e.g., óleo de sésamo, adequado para injeção. São sais particularmente preferidos os sais de zinco, sais tanato de zinco, sais pamoato e similares. Um outro tipo de formulação para depósito de libertação lenta para injeção ou implantação contera o composto ou sal disperso ou encapsulado num polímero não tóxico, não antigénico e de degradação lenta como seja um polímero de ácido poliláctico (ácido poliglicólico). Os compostos ou, de preferência, os sais relativamente insolúveis tais como os descritos atrás podem também ser formulados sedimentos de matrizes de colesterol ou implantações de matrizes de silastómero, particularmente para usar em animais. Outras formulações de libertação lenta, implantação de depósitos ou formulações injectáveis, e.g. lipossomas, são bem conhecidas da literatura. Ver por exemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

#### Síntese dos Peptídeos

Os compostos do presente invento podem ser sintetizados por quaisquer técnicas conhecidas dos

familiarizados com a área dos peptídeos. Um resumo excelente das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em J.M. Stewart e J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis 2nd Edit. Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, 1984 e J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, pág. 46., Academic Press (New York), 1973 para síntese de peptídeos em fase sólida e E. Schroder e K. Lubke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York), 1965 para síntese clássica em solução.

Em geral estes métodos envolvem a adição sequenciada de um ou mais aminoácidos ou aminoácidos adequadamente protegidos a uma cadeia peptídica crescente. Normalmente, o grupo amino ou o grupo carboxilo do primeiro aminoácido é protegido por um grupo protector adequado. O aminoácido protegido ou derivatizado pode estar ligado a um suporte sólido inerte ou ser utilizado em solução pela adição do aminoácido seguinte na sequência tendo o grupo complementar (amina ou carboxilo) adequadamente protegido, em condições adequadas à formação da ligação amida. O grupo protector é então removido deste resíduo de aminoácido recentemente adicionado e o aminoácido seguinte (adequadamente protegido) é então adicionado e assim sucessivamente. Após todos os aminoácidos pretendidos terem sido ligados na sequência adequada quaisquer grupos protectores restantes (é qualquer suporte sólido) serão removidos sequencialmente ou simultaneamente para dar a forma bruta reduzida do polipeptídeo. O polipeptídeo é tornado cíclico por oxidação em solução aquosa diluída usando, por exemplo, ar ( $O_2$ ), ferricianeto de potássio,  $I_2$ ,  $I\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$  e similares, especialmente ferricianeto de potássio. Como alternativa a formação da ponte dissulfureto pode ser efectuada por oxidação da cadeia peptídica mantendo ainda o peptídeo na resina (após clivagem dos grupos protectores de tiol, se necessário). Finalmente o sal é removido do peptídeo e este purificado por cromatografia para dar o produto final.

Os aminoácidos não naturais aqui descritos são preparados por métodos bem conhecidos dos fami-

liarizados com a matéria e podem ser usados nos processos de síntese peptídica em solução ou em fase sólida.

#### Realizações preferidas da síntese

Um método preferido de preparação dos compostos do presente invento envolve a síntese de peptídeos em fase sólida.

Neste método preferido a função  $\alpha$ -amina dos aminoácidos é protegida por um grupo sensível a ácidos ou bases. Tais grupos protectores deverão ter as propriedades de estabilidade nas condições da formação da ligação peptídica, sendo ao mesmo tempo facilmente removidos sem destruição da cadeia peptídica crescente ou racemização de qualquer um dos centros de equivalência de quiralidade existentes. São grupos protectores adequados t-butiloxicarbonilo (Boc), benziloxicarbonilo (Cbz), o-cloro-benziloxicarbonilo (Cl-Z), bifenilisopropiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo,  $\alpha,\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfonilo, 2-ciano-t-butiloxicarbonilo, 9-fluoronilmetiloxicarbonilo (Fmoc) e similares especialmente t-butiloxicarbonilo (Boc).

São grupos protectores das cadeias laterais especialmente preferidos, para lisina: Cbz Fmoc, p-toluenossulfonilo, Boc e adamantiloxicarbonilo; para tixosina: benzilo (Bzl), o-bromobenziloxicarbonilo, 2,6-didorobenzilo, isopropilo, ciclo-hexilo, ciclopentilo e a cetilo; para serina ou treonina: benzilo e tetra-hidropiraniolo; para cisteína: 4-metoxibenzilo (Bzl-OMe), 4-metilbenzilo, benzilo, acetamidometilo, etilcarbamoílo, S-sulfonato; para triptofano:

$N^{IN}$ -formilo ou nenhuma protecção.

O aminoácido C-terminal é ligado a um suporte sólido adequado. São suportes sólidos adequados úteis na síntese referida aqueles materiais inertes para os reagentes e condições de reacção das reacções graduais de condensação-desprotecção, assim como insolúveis nos meios usados. São suportes sólidos adequados polimeros de clorometil-polistireno-divinilbenzeno, polímeros de hidroximetil-polistireno-divinilbenzeno e similares, especialmente o polímero de clorometil-polistireno-1%divinilbenzeno. Quando o extremo C do composto é uma amida (onde Y da fórmula (I) é  $G-NHR_2$ ) um suporte particularmente útil é o polímero p-metil-benzidril-aminopolistireno-divinilbenzeno descrito por Rivaille, et al, Helv. Chim. Acta. 54: 2772 (1971). A ligação à resina do tipo clorometil-polistireno-divinilbenzeno é feita por meio da reacção do aminoácido  $N^{\alpha}$ -protegido, especialmente o Boc-aminoácido na sua forma de sal de cézio, de tetrametilamónio, trietilamónio, 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno ou sais semelhantes em etanol, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida (DMF) e similares, especialmente o sal de cézio em DMF, com a resina clorometilada a uma temperatura elevada, por exemplo entre cerca de 40 e 60°C, de preferência cerca de 50°C, durante cerca de 12 a 48 horas, de preferência cerca de 24 horas. O  $N^{\alpha}$ -Boc-aminoácido é ligado à resina de benzidrilemina, por exemplo, por meio de uma acoplagem mediada por N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/1-hidroxibenzotrizole (HBT) durante cerca de 2 a cerca de 24 horas, de preferência cerca de 2 horas a uma temperatura entre cerca de 10 e cerca de 50°C, de preferência 25°C num solvente como seja diclorometano ou DMF, de preferência diclorometano. A acoplagem de sucessivas aminoácidos protegidos pode ser efectuada num sintetizador de polipeptídeos automático como é do conhecimento geral. A remoção dos grupos  $N^{\alpha}$ -protectores pode ser efectuada na presença, por exemplo, de uma solução de ácido tri-fluoroacético em cloreto de metileno, ácido clorídrico em dioxana, ácido clorídrico em ácido acético, ácido clorídrico em i-PrOH ou outra

solução de ácido forte, de preferência 50% de ácido trifluoroacético (TFA) em diclorometano à volta da temperatura ambiente. Após neutralização com trietilamina ou base semelhante, cada aminoácido protegido é de preferência introduzido num excesso molar de aproximadamente 2,5 vezes e a acoplagem deve ser efectuada em diclorometano, misturas de diclorometano/DMF, DMF e similares, especialmente em cloreto de metileno à volta da temperatura ambiente. O agente de acoplagem é normalmente N,N'-di-ciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em diclorometano mas pode ser N,N'-di-iso-propilcarbodiimida (DIC) ou outras carbodiimidias sózinhas ou na presença de HBT, N-hidroxissuccinimida, outras N-hidroximidias ou oximas. Como alternativa podem ser usados ésteres activos de aminoácidos protegidos (e.g. p-nitrofenilo, pentafluorofenilo e similares) ou anidridos simétricos.

No final da síntese em fase sólida o polipeptídeo totalmente protegido é removido da resina. Quando a ligação ao suporte de resina é do tipo éster de benzilo, a clivagem é por meio de aminólise com uma alquilamina ou fluoroalquilamina para peptídeos com um extremo C de alquilamida ou por aminólise por exemplo com amónia/metanol ou amónia/etanol para peptídeos com um extremo C de amida não substituída a uma temperatura entre cerca de -10 e 50°C de preferência cerca de 25°C, durante entre cerca de 12 e 24 horas de preferência cerca de 18 horas. Os peptídeos com um extremo carboxilo com -COOH livre (extremo C) podem ser obtidos por HF ou outro regime de desprotecção fortemente ácido; ou por saponificação. Como alternativa o peptídeo pode ser removido da resina por transesterificação, e.g., com metanol, seguido de aminólise, saponificação ou redução para dar o álcool do extremo C com  $\text{LiBH}_4$ . Ainda num outro regime alternativo, o extremo C do peptídeo pode ser directamente reduzido para dar o álcool enquanto na resina. O peptídeo protegido pode ser purificado neste ponto por cromatografia em sílica-gel. A remoção dos grupos protectores da cadeias laterais do polipeptídeo é efectuada por tratamento do produto de aminó-

lise por exemplo com fluoreto de hidrogénio líquido anidro na presença de anisole ou outro captador de carbónio, tratamento com o complexo fluoreto de hidrogénio/piridina tratamento com tris/trifluoroacetil/boron e ácido trifluoroacético, por redução com hidrogénio e paládio em carbono ou polivinilpirrolidona, ou por redução com sódio em amónio líquido, de preferência com fluoreto de hidrogénio líquido e anisole a uma temperatura entre cerca de -10 e cerca de +10°C, de preferência a cerca de 0°C, durante entre aproximadamente 15 minutos e 2 horas, de preferência cerca de 1 hora. Para peptídeos na resina benzidrilamina, a clivagem da resina e os passos de desprotecção podem ser combinados num único passo utilizando fluoreto de hidrogénio líquido e anisole como descrito atrás. O polipeptídeo totalmente desprotegido é então tornado cíclico por oxidação através de dissolução numa solução aquosa ou misturado com uma mistura de solventes aquosos/orgânicos e tratamento com ar ( $O_2$ ), ferricamente de potássio,  $I_1$ ,  $ICH_2CH_2I$  e similares, especialmente um equivalente de ferricianeto de potássio. Remove-se o sal da solução (e.g. resina de permuta aniónica AG-3 Bio Rad) e purificada por uma sequência de passos cromatográficos empregando qualquer um ou todos os tipos seguintes: permuta iónica numa resina fracamente básica na forma de acetato; cromatografia de adsorção hidrofóbica em polistireno-divinilbenzeno não derivatizado (por exemplo Amberlite XAD); cromatografia de adsorção em gel de sílica; cromatografia de permuta iónica em carboximetilcelulose; cromatografia de partição, e.g. em Sephadex G-25 ou distribuição contra-corrente; cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), especialmente HPLC de fase reversa em coluna de octil- ou octadecilsilil-silica.

A preparação dos peptídeos tendo uma função álcool C-terminal é de preferência feita usando redução com  $LiBH_4$  do correspondente éster metílico ou éster de peptídeo e resina, preparado como descrito atrás.

Assim, um outro aspecto do presente invento está relacionado com um método para a preparação de compostos do invento e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis processo esse que se caracteriza por:

remoção dos grupos protectores e, facultativamente, do suporte sólido covalentemente ligado de um polipeptídeo protegido para dar um composto da fórmula (I) ou (II) descrito atrás ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que o composto compreende:

- (a) um peptídeo cíclico tipo somastostatina e
- (b) uma âncora catiónica ligada a um ou a ambos os resíduos Cis do peptídeo.

#### EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem são ilustrativos e não limitantes do invento. Exemplos gerais das vias de síntese para a síntese da classe de  $hA\bar{R}g(R_2)$  dos aminoácidos não naturais estão descrito em Nestor, et al., J. Med. Chem. 31: 65 (1988) e na Patente U.S. 4667014 publicada em 19 de Maio de 1987.

Os compostos da fórmula (I) e (II) foram sintetizados usando o seguinte composto cuja preparação se segue. Hidrocloreto de  $N^\alpha$ -t-butiloxicarbonil- $N^G, N^{G'}$  bis-1,1,1-trifluoroetil-D-homoarginina foi preparado como se segue.

Uma mistura de 7,33 g de benzil- $N_{\alpha}$ -benziloxicarbonil-D-lisinato toluenossulfonato (B. Bezus e L. Zervas, J. Am. Chem. Soc. 83: 719 (1961)) e 3,60 g de 1,1,1-trifluorodietiltioreia (M. Uher e J. Jendrichovsky, Coll. Czech 38: 289 (1973)) em 50 ml de  $CH_3CN$  e 50 ml de THF foi tratada com 2,06 g de  $HgCl_2$  e 3,3 g de trietilamina. A mistura de reacção foi aquecida até 80-90°C durante 8 horas seguidas da adição de 20% de  $HgCl_2$ , trietilamina e tioreia. O aquecimento continuou durante mais 15 horas. A reacção foi arrefecida até à temperatura ambiente, filtrada através de celite e concentrada in vacuo até secagem. O resíduo foi aplicado numa coluna de gel de sílica e eluido com um gradiente de  $CH_2Cl_2/MeOH$  (19:1) até  $CH_2Cl_2/MeOH$  (4:1). As fracções contendo o produto foram detectadas por cromatografia em camada fina (TLC), reunidas e concentradas até secagem para dar 7,6 g de espuma amarela. A espuma foi repurificada numa segunda coluna de gel de sílica eluida com um gradiente de  $CH_2Cl_2/MeOH$  (9:1) a  $CH_2Cl_2/MeOH$  (4:1) e depois  $CH_2Cl_2/MeOH$  (4:1) isocrático. As fracções contendo o produto foram detectadas por TLC, reunidas e concentradas até secagem para dar 7,0 g de benzil- $N_{\alpha}$ -benziloxicarbonil- $N^G, N^{G'}$  bis 2,2,2-trifluoroetil D-homoarginato toluenossulfonato  $[\alpha]_D^{25}$  10,2° (C 1,5, MeOH).

Uma porção de 6 g do produto atrás referido e 1 g de 10% Pd/C em 150 ml de EtOH foi tratado com hidrogénio à pressão atmosférica durante 3 horas. Adicionou-se mais 0,4 g de 10% Pd/C e a hidrogenação continuou durante mais 3 horas. A mistura de reacção foi filtrada através de Celite, concentrada até secagem para dar 4 g de  $N^G, N^{G'}$  bis-(2,2,2-trifluoroetil)-D-homoarginina-toluenossulfonato  $[\alpha]_D^{25}$  -7,76° (CO, 4, MeOH).

Uma solução deste composto (1,96 g) em 8 ml de 1M NaOH e 8 ml de dioxana foi tratada com 160 mg de MgO e 1,05 g de di-t-butildicarbonato a 0°C. A mistura de reacção foi agitada a 0°C durante 1 hora e depois à temperatura ambiente durante 3 horas. O sal de magnésio foi removido

por filtração e o filtrado concentrado sob vácuo. A solução básica foi lavada com éter dietílico anidro, depois acidificada a 0°C com 1N HCl para pH 3,5. O produto foi extraído da solução aquosa acíclica com acetato de etilo e seco sobre sulfato de magnésio. O agente de secagem foi removido por filtração e o filtrado concentrado até secagem para dar uma espuma branca. A espuma foi tratada com esferas de AG-3 Cl<sup>-</sup> para converter o produto na forma de sal cloreto. Isolou-se 1,4 g de hidrocloreto de N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-N<sup>G</sup>,N<sup>G'</sup>-bis-2,2,2-trifluoroetil-D-homoarginina,  $[\alpha]_D^{25} -2,19^\circ$  (C 0,5, MeOH).

#### EXEMPLO 1

##### Síntese de compostos da Fórmula (I)

No vaso de reacção de um Sintetizador de peptídeos Beckman 990 colocou-se 11,11 g ( 4 mmoles) da resina 4-metil-benzidrila. Os aminoácidos foram sequencialmente adicionados à resina por meio de um programa de síntese. Um programa de síntese típico é como descrito na Patente U.S. 4 667 014 publicado em 19 de Maio de 1989, coluna 21. Podem igualmente ser usados programas de síntese semelhantes para uso noutros Sintetizadores de Peptídeos à venda.

A. Para a preparação de um composto preferido da fórmula (I) a resina foi acoplada sequencialmente com um excesso molar de 2,0 a 2,5 molar de cada aminoácido protegido e DCC. A resina foi tratada durante ciclos de acoplagem sucessivos com

3,09 g Boc-Tre(Bzl)-OH e 4 g HBT

3,42 g Boc-Cis(Bzl-OMe)-OH

3,09 g Boc-Tre(Bzl)-OH

4,14 g Boc-Lis(Cb-Z)

3,04 g Boc-D-Trp-OH

Após a acoplagem de D-Trp, 0,5% indole foi adicionado à solução de desbloqueamento. A resina foi então tratada sucessivamente com

2,65 g Boc-FenOH

3,42 g Boc-Cis(Bzl-OMe)-OH

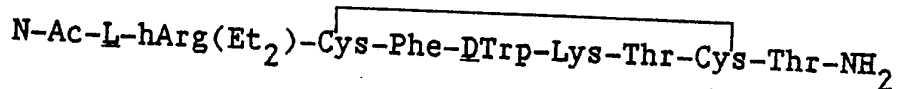
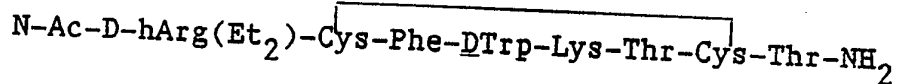
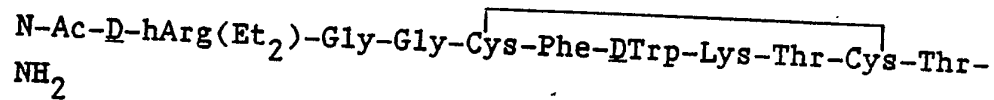
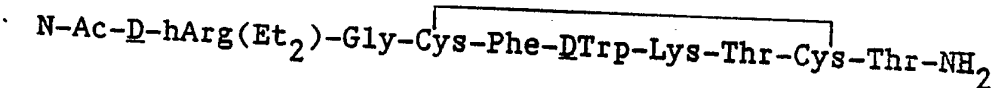
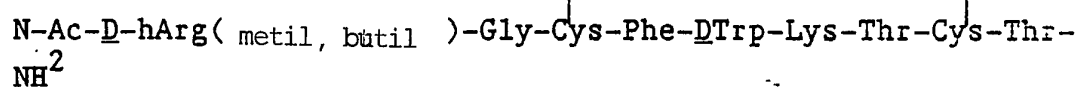
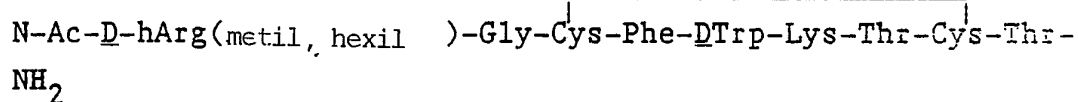
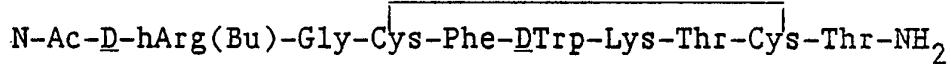
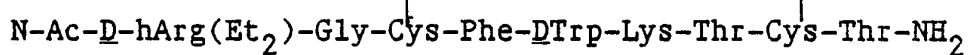
1,75 g Boc-Gli-OH

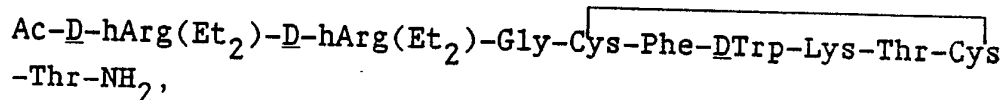
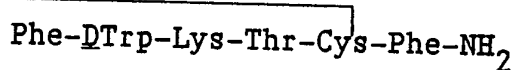
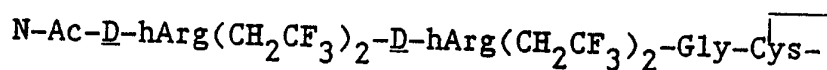
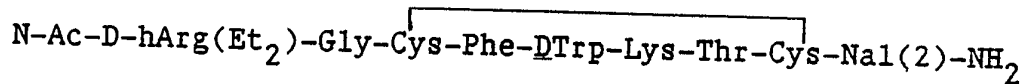
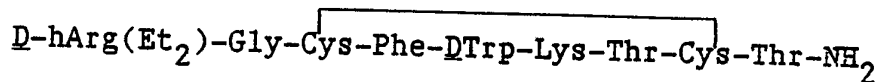
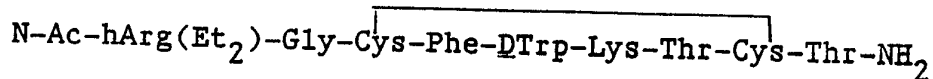
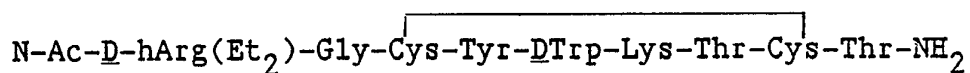
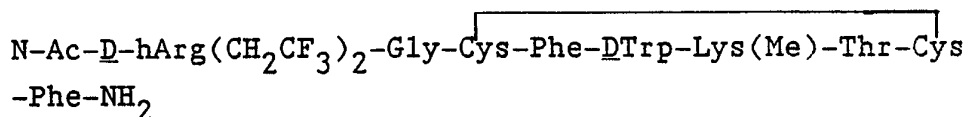
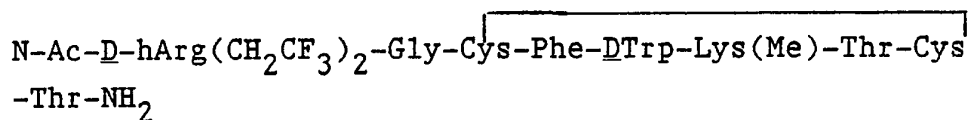
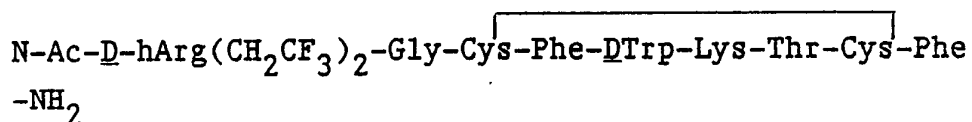
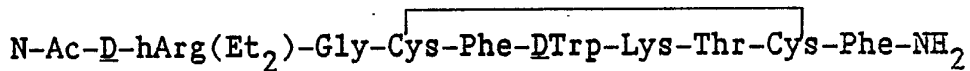
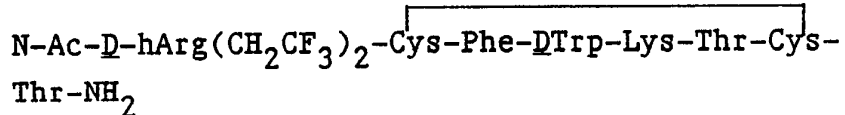
Nesta altura a resina com o heptopeptídeo resultante foi dividida em pequenos lotes. Um lote de 3,37 g (0,75 mmoles) continuou a ser processado por acoplagem em ciclo sucessivos com 1 g de Boc-D-PrArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OH + 1 g HBT seguido de 2 ml de anidrido acético em 12,4 ml de DMF.

A resina foi removida do vaso de reacção, lavada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e seca sob vácuo para dar 3,07 g da resina com polipeptídeo protegido. O peptídeo foi desprotegido e removido da resina por tratamento com 30 ml de HF líquido anidro na presença de 3 ml de anisole (captador) num vaso de reacção Kel-F a 0°C durante 1 hora. O HF foi evaporado sob vácuo e o resíduo de N-Ac-DhArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Gli-Cis-Fen-DTrp-his-Tre-Cis-Tre-NH<sub>2</sub>, na forma de sal HF foi lavado com éter. O resíduo foi então extraído com água nanopura (11). Os extractos foram diluídos imediatamente para um volume total de 4 l com água nanopura.

O pH da solução foi ajustado a 7,5-8 com solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluída. O peptídeo foi tornado cíclico pela adição lenta de 80 ml de solução 0,01 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . A solução de peptídeo diluído foi acidificada para pH 4,5 com uma solução de com 10% ácido acético e aplicada numa coluna Biorex 70 protonada (Biorad Laboratories, Hercules, CA) empacotada com água. Após aplicação os restantes sais foram removidos por lavagem da coluna com 2 litros de água. O peptídeo foi eluído da coluna com um gradiente de 1 l de 5% HOAc a 1 l de 50% HOAc e depois continuando com 1 l de 50% HOAc. Colheram-se 190 fracções (20-30 ml) com um colector de fracções automático ISCO. Mediu-se a absorvância a  $\lambda = 280$  nm de cima em cinco fracções num espectofotómetro Hewlett-Packard 8450A UV/VIS. Os resultados foram representados gráficamente e as fracções 30-55, 56-90 e 91-120 foram reunidas, evaporadas até secagem e cada uma novamente dissolvida em 100 ml de água. O material bruto foi convertido no sal de acetato por passagem em água através de uma coluna de AG3X (uma resina de amina terciária ligeiramente básica) que foi convertida à forma de acetato. A liofilização das fracções deu 250 mg, 350 mg e 125 mg respectivamente. Os conjuntos de fracções foram analisados num sistema de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) Spectra Physics numa coluna Vydac RP-18. Os lotes de 250 ng + 350 mg foram purificados por HPLC numa coluna de 200 g de Vydac RP-18 (20-30 micron) equilibrada um tampão de corrida 28%  $\text{CH}_3\text{CN}/72\%$   $\text{H}_2\text{O}$  (0,03 M em  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 4,5). Colhem-se o pico principal de absorção de UV (280 nm), concentrou-se até secagem e liofilizou-se três vezes a partir de água nanopura para dar 135 mf do peptídeo cíclico puro

B. Procedendo de modo semelhante ao estabelecido na parte A, mas substituindo os aminoácidos protegidos adequados, prepararam-se os seguintes compostos:





EXEMPLO 2

Síntese de compostos de Fórmula (I) com uma função alquilamida C-terminal

A síntese de compostos tendo uma função alquilamida C-terminal (Y é G-I onde I é  $-NHR_2$ ,  $R_2$  sendo alquilo) foi alterada para permitir a clivagem da resina por aminólise com a alquilamina adequada. O vaso de reação do Exemplo I foi cheio com 1,24 g de Boc-Tre(Bzl)-O-Resina, preparado por reacção a 50°C em DMF durante 24 h do sal seco de Boc-Tre(Bzl)-OH num excesso de 20 moles por cento com clorometilpolistireno-1%-divinilbenzeno (~1 mmol de Cl disponível/g de resina; BioRad Labs). Isto deu um aminoácido protegido ligado à resina através de uma ligação do tipo éster benzílico que posteriormente pode ser aminolizado.

O aminoácido-O-resina foi acoplado sequencialmente com um excesso molar de 2 a 2,5 vezes do aminoácido protegido adequado usando dispropilcarbodiimida (DIC). Assim o aminoácido-resina foi tratado durante ciclos sucessivos de acoplagem com:

0,857 g Boc-Cis-(Bzl-OMe)-OH

0,77 g Boc-Tre(Bzl)-OH

1,04 g Boc-Lis-(Cl-Z)

0,76 g Boc-D-Trp-OH e 0,1% de indole foi adicionado à solução de desprotecção de  $CF_3CO_2H$  para posteriores desprotecções,

0,66 g Boc-Fen-OH

0,85 g Boc-Lis(Bzl-OMe)-OH

0,44 g Boc-Gli-OH

0,99 g Boc-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-OH e 1 g de HBT,

2 ml de anidrido acético em 8,2 ml de DMF.

O peptídeo-resina foi removido do vaso de reacção, lavado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e seco sob vácuo para dar 2,15 g do peptídeo protegido-0-resina. O polipeptídeo protegido foi clivado da resina por aminólise com 50 ml de etilamina durante 8 horas a  $0^\circ\text{C}$ . A etilamina foi deixada evaporar e a resina extraída com metanol. A resina seca pesava 1,2 g e foi novamente tratada com etilamina para dar mais 400 mg do peptídeo protegido. Este peptídeo protegido foi misturado com 2 ml de anisole e 20 ml de HF líquido anidro redistilado (a partir de  $\text{CoF}_3$ ) a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 hora num vaso de reacção Kel-F. O HF foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi lavado com éter dietílico anidro. O peptídeo foi dissolvido em 4 litros de  $\text{H}_2\text{O}$ . O pH de solução foi ajustado a 7,5-8,0 e o composto foi tornado cíclico por oxidação com a adição lenta de 30 ml de uma solução 0,01 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . O pH foi reajustado a 4,5 e a solução de peptídeo diluída foi aplicada numa coluna de BioRex 70 protonado empacotada com água. Os sais de Fe possam através da coluna. O peptídeo foi eluído da coluna com um gradiente que vai de 1 l de 5% HOAc até 1 l de 50% HOAc e depois continuando com 1 l de 50% HOAc. As fracções foram reunidas e mantidas para purificação com base nas suas densidades ópticas a  $\lambda=280$  nm e avaliação por RP-HPLC analítica. O material bruto foi convertido no sal de  $\text{AcO}^-$  por passagem em água através de uma coluna de resina de permuta aniónica (AG3X, BioRad) que foi convertida à forma de acetato. A liofilização do eluato deu 175 mg do peptídeo bruto.

O peptídeo foi purificado por RP-HPLC preparativa numa coluna de 2,5 x 100 cm de Vydac RP-18 (20-30 microns) equilibrada no tampão de corrida 25%  $\text{CH}_3\text{CN}/75\%$   $\text{H}_2\text{O}$  (0,03M em  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 4,5). Colheu-se o pico principal de absorção de UV (280 nm), concentrou-se até secagem e liofilizou-se três vezes a partir de água nanopura para dar 35mg do produto cíclico.

N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt,  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -14.1° (C0.4, HOAc).

A síntese de análogos adicionais com extremos etilamida foi efectuada de modo semelhante.

EXEMPLO 3

Síntese de compostos da Fórmula (I) tendo um extremo C reduzido

Compostos com um extremo C reduzido (Y é o álcool de G-I) foram preparados por redução da ligação éster do peptídeo-0-resina com LiBH<sub>4</sub>. A síntese do peptídeo pode seguir sem protecção da cadeia lateral excepto para Lis e Cis. Assim uma porção de 1 g (1 mmol) de Boc-Tre-0-resina foi tratada sucessivamente (como descrito no Exemplo 1) com 0,73 g de Boc-Cis(acetamidometil)-OH,

0,55 g Boc-Tre-OH,

1,17 g Boc-Lis(Fmoc)-OH e 1 g HBT,

0,76 g Boc-D-Trp-OH, após o que se adicionou 0,1% indole à

solução de desprotecção de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  
0,66 g Boc-Fen-OH,  
0,73 g Boc-Cis(acetamidometil)-OH  
0,94 g Boc-Gli-OH,  
0,99 g Boc-D-hArg( $\text{Et}_2$ )-OH e 1 g HBT,  
2 ml de anidrido acético em 7,2 ml de DMF.

O peptídeo-0-resina parcialmente protegido foi removido do vaso, lavado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e seco sob vácuo. O peptídeo-0-resina foi inchado em 75 ml de THF seco e tratado com 145 mg de  $\text{LiBH}_4$  em quatro porções. Após 1 h à temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 ml de AcOH gota a gota para destruir o  $\text{LiBH}_4$  em excesso. A mistura de reacção foi filtrada, o resíduo foi lavado com AcOH glacial e o filtrado foi concentrado. O álcool reduzido do peptídeo parcialmente protegido foi obtido por liofilização a partir de AcOH glacial. O resíduo Lys (Fmoc) foi removido por tratamento com piperidina a 20% em DMF durante 30 min. A solução foi neutralizada (AcOH) e removido o sal por cromatografia hidrofóbica em Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas, Philadelphia, PA.) com um gradiente de  $\text{H}_2\text{O}$  a 50% EtOH. O pico principal de absorção de UV ( $\lambda$  máx 280) foi desprotegido e tornado cíclico por tratamento gota a gota com uma solução de  $\text{I}_2$  em MeOH até não haver mais gasto da côr.

O produto bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa numa coluna de 2,5 x 100 cm de Vydac RP-18 (20-30 microns) usando 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0,04M em  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 4,5) como eluente. O principal pico de absorção de UV foi reunido, concentrado até secagem e liofilizado 3 vezes a partir de  $\text{H}_2\text{O}$  para dar

Ac-D-hArg( $\text{Et}_2$ )-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol.

EXEMPLO 4Ensaio do glucagon induzido pela insulina

Após vários dias de aclimatização agruparam-se ratos por peso e usaram-se entre um e três dias depois. Os ratos foram injectados subcutâneamente com 40 mg/kg de pentobarbital (Nembutal). Aproximadamente 30 min após a injeção, as veias jugular e porta hepática foram expostas e uma injeção de 0,1% de albumina de soro bovino (BSA)-veículo soro fisiológico ou 1UI/l ml/kg de insulina porcina no mesmo veículo foi administrado na veia jugular. Precisamente 15 minutos após a injeção intravenosa (i.v.) colheu-se uma amostra de 1 ml de sangue a partir da veia porta hepática e o rato foi sacrificado com CO<sub>2</sub>.

A amostra de sangue foi colhida para uma seringa contendo 0,70 mg Na-EDTA e 0,1 mg de Aprotina, um inibidor de proteases comercial em 0,1 ml de 0,9% NaCl. A amostra de sangue foi misturada na seringa e transferida para um tubo de plástico separador de soro e mantido em gelo no escuro. O plasma foi colhido dentro de 6 horas por centrifugação e guardado a -20°C. O material a testar foi administrado por via intramuscular ao animal imediatamente antes da injeção i.v. de insulina. As amostras de plasma foram analisadas quanto aos níveis de glucagon usando um "kit" de radioimunoensaio comercial para o glucagon animal (Cambridge Medical Technology).

A percentagem de inibição da libertação de glucagon foi calculado para cada animal que receber o composto a testar multiplicando por 100 o nível médio de glucagon das "testemunhas positivas", onde as "testemunhas positivas" são definidas como os animais que receberam insulina i.v. e nenhum composto teste, menos o nível de glucagon

do animal teste dividido pelo nível médio de glucagon das "testemunhas positivas" menos o nível médio de glucagon das "testemunhas negativas", onde "testemunhas negativas" é definido como os animais que receberam o veículo i.v. e nenhum composto teste. A inibição percentual média foi representada gráficamente em função da dose do composto a testar e calculado ED<sub>50</sub>. O ED<sub>50</sub> representa a dose necessária para produzir 50 por cento de inibição da libertação de glucagon induzido pela insulina.

Resultados

ED<sub>50</sub>

N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-

Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>

0.15 µg/kg

No ensaio atrás descrito, as potências relativas de

N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>

comparado com somatostatina e Sandostatina tendo a fórmula

D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH

were 50X and 4X, respectively.

foram de 50X e 4X, respectivamente.

EXEMPLO 5

Ensaio da insulina induzida por glucose

Após vários dias de aclimatização, agruparam-se ratos por peso e usaram-se entre um e três dias depois. Os ratos foram injectados subcutâneamente com 60 mg/kg de pentobarbital (Nembutal). Aproximadamente 40 minutos após injeção a veia jugular foi exposta e uma injeção de 0,1% BSA-soro fisiológico ou 0,5 g/2 ml/kg de glucose no mesmo veículo foi administrado na veia jugular. Precisamente 5 min. após a injeção i.v. colheu-se uma amostra de 1 ml de sangue via sinus orbital e o rato foi morto com CO<sub>2</sub>.

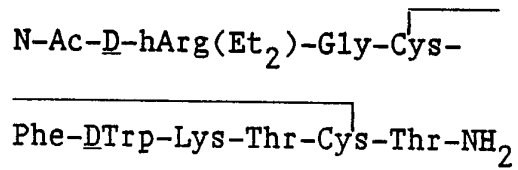
A amostra de sangue foi colhida para tubos de vidro contendo 72 unidades USP de heparina de lítio e mantida em gelo. Colheu-se plasma dentro de 2 horas por centrifugação e guardou-se a -20°C. O material a testar foi administrado ao animal 10 minutos antes da injeção i.v. de glucose. As amostras de plasma foram analisadas quanto aos níveis de insulina usando um "kit" de radioimunoensaio comercial para a insulina animal (Cambridge Medical Technology).

A percentagem de inibição da libertação de insulina foi calculada para cada animal que recebeu o composto a testar multiplicando por 100 o nível médio de insulina das "testemunhas positivas", onde "testemunhas positivas" é definido como os animais que receberam glucose i.v. e nenhum composto a testar, menos o nível de insulina do animal teste dividido pelo nível médio de insulina das "testemunhas positivas" menos o nível médio de insulina das "testemunhas negativas", é definido como os animais que receberam veículo i.v. e nenhum composto a testar. A percentagem média de inibição foi representada graficamente em função da dose do composto a testar e o ED<sub>50</sub> determinado. O ED<sub>50</sub> repre-

sentando a dose necessária para produzir 50 por cento de inibição da libertação de insulina.

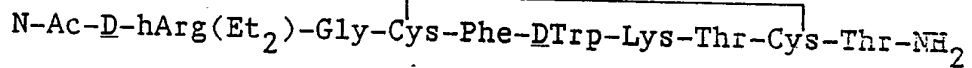
Resultados

ED<sub>50</sub>



20 µg/kg

No ensaio atrás descrito, as potências relativas de



comparado com a somatostatina e Sandostatin foram de 6X e 0,3X, respectivamente.

EXEMPLO 6

Ensaio da hormona de crescimento induzida pelo Nembutal

Após vários dias de aclimatização, ratos macho foram agrupados pelo peso e usados entre um e

três dias depois. Os ratos foram mantidos em jejum no dia antes de serem usados. A cada rato teste foi dada uma injeção intramuscular (IM) do composto teste ou veículo (0,1% BSA-soro fisiológico) na perna direita.

Imediatamente após a injeção intramuscular deu-se uma injeção subcutânea de Nembutal (60 mg/kg). Trze minutos após a administração de Nembutal, cada rato foi exposto durante 2 minutos a anestesia com éter seguido de colheita de uma amostra de 1 ml de sangue via órbita ocular. Tubos separadores de soro foram usados para prefurar soro a partir de amostras de sangue. As amostras de soro foram guardadas a -20° até análise por radioimunoensaio. A percentagem média de inibição da hormona de crescimento foi determinada para os compostos a testar usando o método descrito no Exemplos 4 e 5 e determinado ED<sub>50</sub>.

Resultados

ED<sub>50</sub>

N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-

Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>

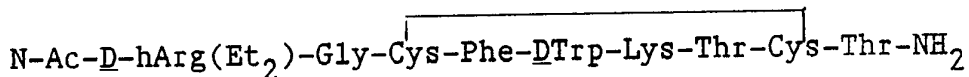
0.025 µg/kg

No ensaio atrás descrito, as potências relativas de

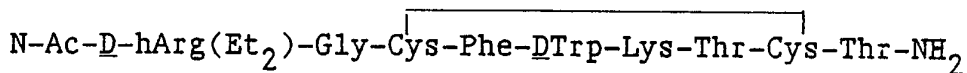
N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>

comparadas com somatostatina e Sandostatina foram de 265X e 3X respectivamente.

As selectividades relativas para glucogán/insulina e hormona de crescimento/insulina para



foram de 133 e 769, respectivamente, versus valores para Sandostatina de 11 e 103. Aumentando o intervalo de tempo entre a dosagem de

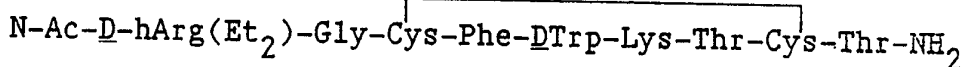
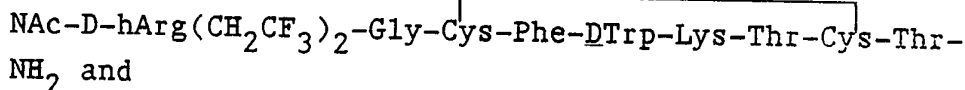


e os agentes de desafio (glucose, i.v., insulina i.v. e nembutal sc) também revelou uma vida do análogo extremamente longa comparada com a da somatostatina.

#### EXEMPLO 7

#### Toxicidade

Dois análogos da somatostatina



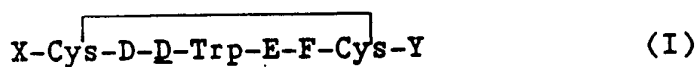
foram administrados intramuscularmente ao rato em doses até 2,43 mg/kg no ensaio da insulina induzida por glucose, sem

se observarem efeitos adversos. No ensaio ratos macho forem anestesiados com pentobarbitol e dada uma injeção intravenosa de glucose. Colheu-se uma amostra de sangue 5 minutos após a injeção de glucose e testou-se mais tarde quanto ao nível de insulina. O análogo da somastostatina foi administrado por via intramuscular aos 15 minutos, 1 hora ou 2 horas antes de retirar a amostra de sangue. Os ratos foram mortos após se retirar a amostra de sangue. Um total de 24 ratos recebeu uma dose de 2,43 mg/kg de RS-45917-298 e outros 24 ratos receberam uma dose de 2,43 mg/kg de RS-10962-298. Para cada composto 8 ratos foram injectados 15 minutos antes de se retirar a amostra de sangue e 16 ratos foram injectados 2 horas antes de se retirar a amostra de sangue. Nenhum dos ratos apresentou qualquer reacção adversa à dose de qualquer um dos compostos.

A descrição e os exemplos atrás apresentados descrevem o invento na sua totalidade incluindo as suas realizações preferidas. Modificações dos métodos descritos que sejam óbvias para os familiarizados com a área da química de peptídeos pretende-se que estejam dentro do âmbito das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a preparação de um composto da fórmula



onde,

X é uma âncora do extremo

Y é uma âncora do extremo C, G-I ou álcool de G-I; em que pelo menos um de X e Y é uma âncora catiónica;

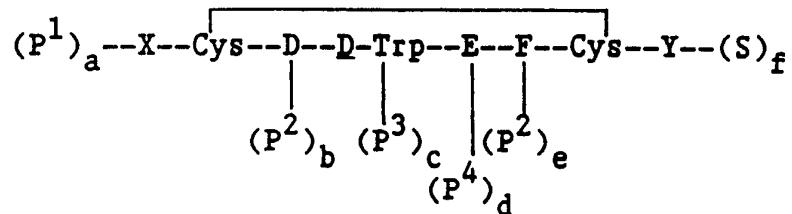
D é Fen, Tir, pF-Fen, pCl-Fen;

E é Lis ou Lis ( $R_1$ ) onde  $R_1$  é um alquilo inferior ou fluoroalquilo com 1 a 8 átomos de carbono;

F é Tre, Val, Ser;

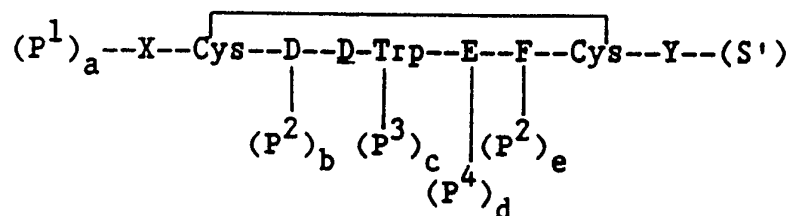
G é a configuração D ou L de Tre, Fen ou Nal (2); e I é -OH ou -NHR<sub>2</sub> onde  $R_2$  é H ou uma substituição seleccionado entre  $R_1$  atrás; e de seus sais farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado por compreender:

- a) a remoção de grupos protectores de um composto da fórmula



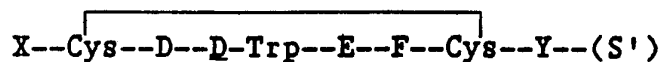
onde X, Y, D, E e F são como definido atrás;  
 $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são grupos protectores onde  $P^1$  é um protector de  $\alpha$ -amino,  $P^2$  é um grupo protector de hidroxilo,  $P^3$  é um grupo  $N^{IN}$ -protector e  $P^4$  é um grupo protector de  $\xi$ -amino;  
 S é um grupo protector de carboxilo; e a, b, c, d, e, e f são números inteiros iguais a 0 ou 1, desde que todos de a a f não sejam 0; ou

b) a remoção simultânea dos grupos protectores e de um suporte polimérico de um composto da fórmula



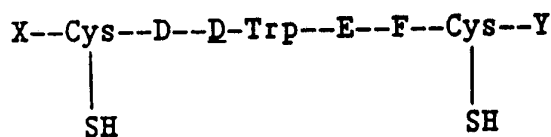
onde, X, Y, D, E, F, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> e P<sup>4</sup> são como definidos no parágrafo (a) atrás; a, b, c, d, e e são inteiros iguais a 0 ou 1, desde que todos desde a a c não sejam 0; e S é um suporte polimérico;

c) a remoção de um suporte polimérico de um composto da fórmula



onde X, Y, D, E, F e S' são como definidos no parágrafos (b) atrás; ou

d) a oxidação de um composto da fórmula



onde X, Y, D, E e F são como definidos na parágrafo (a) atrás; ou

e) conversão de um composto de fórmula I num sal farmacêuticamente aceitável; ou

f) conversão de um sal do composto de fórmula I num outro sal farmacêuticamente aceitável; ou

g) conversão de um sal do composto da fórmula I no peptídeo livre.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por X ser um radical N<sup>w</sup>-alquil-aminoácido básico ligado à fracção Cis directamente ou através de um espaçador.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por

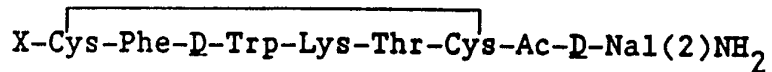
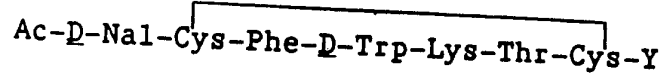
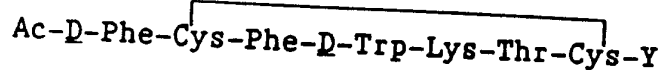
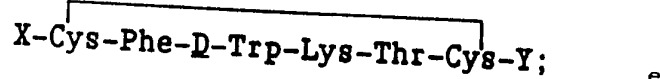
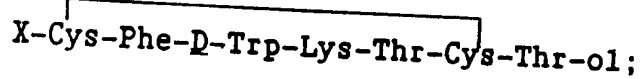
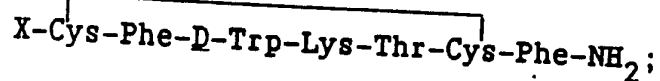
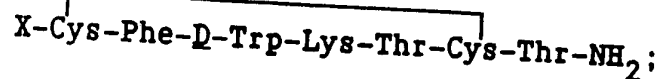
X ser A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub>, onde A é acilo ou H;  
B é hArg(R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>), Arg (R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>) ou Lis (R<sub>1</sub>), onde R<sub>1</sub> é alquilo inferior ou fluoroalquilo com 1 a 8 átomos de carbono e R<sub>2</sub> é independentemente H ou R<sub>1</sub>;  
m é um inteiro de 1 a 3;  
C é Gli, Ala, B-Ala; e  
n é um inteiro de 0 a 5.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por

X ser A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub>, onde A é acilo ou H;  
B é hArg(R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>), Arg (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) ou Lis (R<sub>1</sub>), onde R<sub>1</sub> é alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono e R<sub>2</sub> é independentemente H ou R<sub>1</sub>;  
m é um inteiro entre 1 e 3;  
C é Gli, Ala, β-Ala ou hArg(R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>); e  
n é 0 ou 1.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Y ser uma âncora do extremo C da fórmula  $A-(B)_m-(C)_n$  onde A, B, C, m e n são como definidos na reivindicação 3.

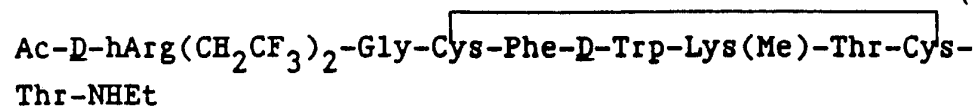
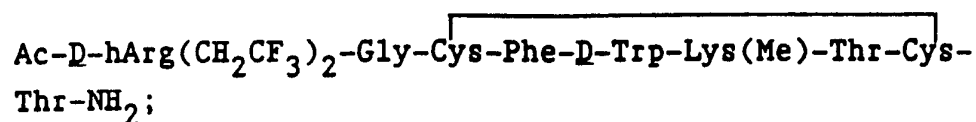
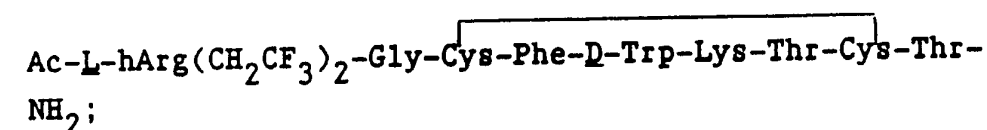
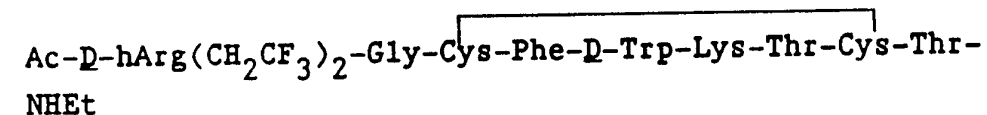
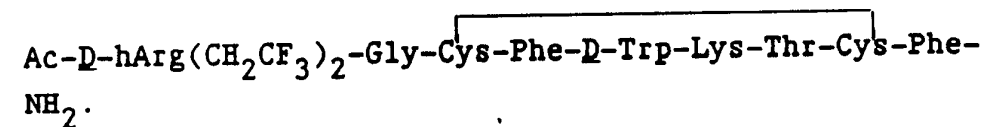
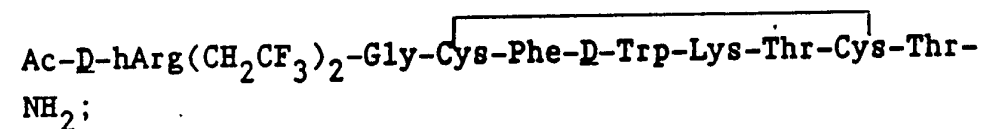
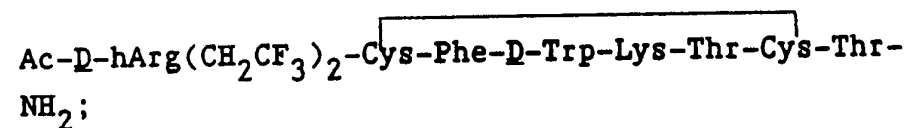
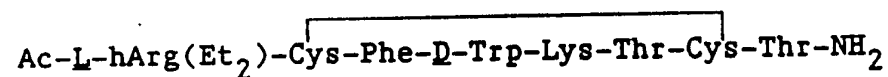
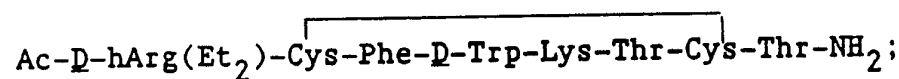
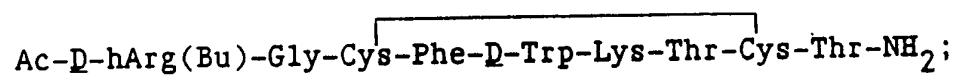
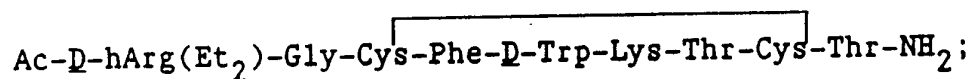
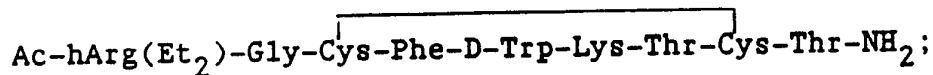
6a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser seleccionado a partir do grupo constituído por:



onde X é uma âncora catiónica e Y é uma âncora do extremo C.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por ser seleccionado a partir

do grupo constituído por:



Ac-hArg(CH<sub>3</sub>, hexyl)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>;

H-hArg(hexyl)<sub>2</sub>-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>;

Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt;

Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH<sub>2</sub>;

Propionil -D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(iPr)-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>;

Ac-D-Nal(2)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Gly-hArg(Et)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>;

Ac-D-Lys(iPr)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>;

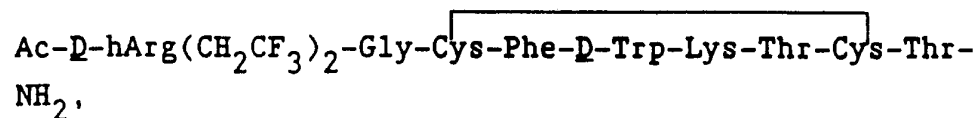
Ac-D-hArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-D-hArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>; e

N-Ac-D-hArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-D-hArg(CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH<sub>2</sub>;

N-Ac-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-D-hArg(Et<sub>2</sub>)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>.

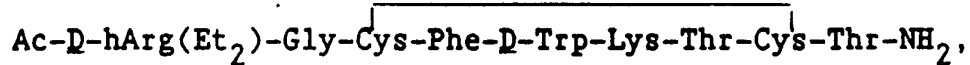
e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

8a. - Processo de acordo com a Reivindicação 7, caracterizado por se preparar um composto que é



e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por se preparar um composto que é



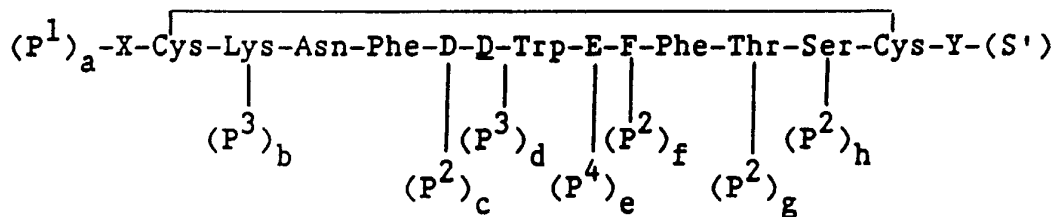
e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

10a. - Processo para a preparação de um composto da fórmula:



onde X, Y, D, E e F são como definidos atrás;  
 $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são grupos protectores onde  $P^1$  é um grupo protector de  $\alpha$ -amino,  $P^2$  é um grupo protector de hidroxilo,  $P^3$  é um grupo  $N^{IN}$ -protector e  $P^4$  é um grupo protector de  $\xi$ -amino S é um grupo protector de carboxiloi; e a, b, c, d, e, f, g, h e i são inteiros iguais a 0 ou 1, desde que todos de a a i não sejam 0; ou

b) a remoção simultânea de grupos protectores e de um suporte polimérico de um composto de fórmula



onde X, Y, D, E, F,  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  e  $P^4$  são como definidos no parágrafo (a) atrás;

a, b, c, d, e, f, g e h são inteiros iguais a 0 ou 1, desde que todos de a a h não sejam 0; e

S' é um suporte polimérico; ou

c) a remoção de um suporte polimérico de um composto da fórmula



11a. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por X ser um radical N<sup>W</sup>-alquil-aminoácido básico ligado à fracção Cis directamente ou através de um espeçador.

12a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por X ser A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub>, onde A é acilo ou H; B é hArg(R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>), Arg(R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) ou Lis (R<sub>1</sub>), onde R<sub>1</sub> é alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono, e R<sub>2</sub> é independentemente H ou R<sub>1</sub>; m é um inteiro de 1 a 3; C é Gli, Ala, β-Ala; e n é um inteiro de 0 a 5,

13a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por X ser A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub>, onde A é acilo ou H; B é hArg (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>), Arg (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) ou Lis (R<sub>1</sub>), onde R<sub>1</sub> é alquilo inferior ou fluoroalquilo de 1 a 8 átomos de carbono e R<sub>2</sub> é independentemente H ou R<sub>1</sub>; m é um inteiro de 1 a 8; C é Gli, Ala, β-Ala; e n é 0 ou 1.

14a. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por Y ser uma âncora do extremo C da fórmula A-(B)<sub>m</sub>-(C)<sub>n</sub> onde A, B, C, m e n são como definido na reivindicação 10.

15a. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o análogo dodecapeptídeo ser seleccionado a partir do grupo constituído por:

X-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH;

X-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH;

X-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Cys-OH;  
and

X-Cys-Phe-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH

onde X é a âncora catiónica.

16a. - Método para o tratamento de tumores, caracterizado por compreender a administração a um ser humano de uma quantidade eficaz de um composto da reivindicação 1 ou da reivindicação 10, e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, ou de uma composição farmacêutica contendo os mesmos, numa gama de dosagem de cerca de 0,001 a cerca de 10,0 µg/kg do peso corporal, de preferência de cerca de 0,01 a 5,0 µg/kg do peso corporal.

17a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento de diabetes através da supressão da libertação da hormona de crescimento ou de glucagon num ser humano, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de um composto da reivindicação 1 ou da reivindicação 10 e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, juntamente com um seu veículo farmacêutico.

18a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento de tumores, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de um composto da reivindicação 1 ou da reivindicação 10 e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, juntamente com um seu veículo farmacêutico.

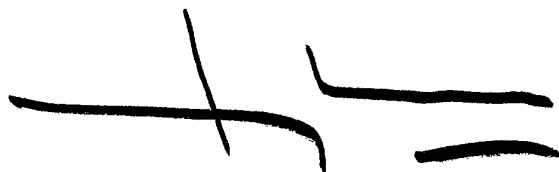
19a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento de diabetes através da redução da absorção de nutrientes com açúcar e aminoácidos a partir do tracto gastrointestinal num ser humano, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de um composto da reivindicação 10, e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, juntamente com um seu veículo farmacêutico.

20a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica útil no tratamento de úlceras por supressão da secreção ácido gástrico num ser humano, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de um composto da reivindicação 1 ou da reivindicação 10 e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, juntamente com um seu veículo farmacêutico.

21a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se incluir na referida composição um excipiente farmacêuticamente aceitável.

vel e uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto da reivindicação 1 ou da reivindicação 10 e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa, 4 de Agosto de 1989



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