Ref.: 390106

DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.485

REQUERENTE: MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC., norte-americana, com sede em 2110 East Galbraith Road, Cincinnati, Ohio 45215, Estados Unidos da América,

EPÍGRAFE: "Processo para a preparaçãi de derivados peptídicos anticoagulantes radiomarcados"

INVENTORES: John Leonard Krstenansky,
Simon Jen Tan Mao,

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

U.S.A., 03.10.1989, sob o Nº 416,335

MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS PEPTÍDICOS ANTICOAGULANTES RADIOMARCADOS"

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos péptidos anticoagulantes, susceptíveis de serem marcados radioactivamente e, como tal, constituem reagentes valiosos para a detecção de trombina no organismo ou em amostras adequadas utilizando um conjunto de diagnóstico.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

Os anticoagulantes são agentes terapêuticos úteis no tratamento farmacológico de, por exemplo, trombose venosa aguda profunda, embolia pulmonar, embolia arterial aguda das extremidades, enfarte do miocárdio e coagulação intravascular disseminada. Crê-se que a administração profiláctica de anticoagulantes evite a recidiva de embolias em pacientes com doença cardíaca reumática ou arterioesclerótica e evite determinadas complicações tromboembólicas provenientes de actos cirúrgicos. A administração de anticoagulantes é ainda indicada no tratamento de doenças

cerebrovasculares e das artérias coronárias. A trombose arterial, especialmente nas artérias que alimentam o músculo cardíaco e o cérebro, constitui uma das causas de morte.

O hirudin consiste num polipéptido de resíduo de 65 aminoácidos que se isolou nas glândulas salivares de sanguessugas. É um inibidor específico da trombina e, por esse motivo, pode utilizar-se como um agente anticoagulante. Apesar de ser bastante potente, a utilização clínica de hirudin isolado dos extractos de sanguessugas parece ser pouco vantajosa, devido à sua limitada quantidade, custos e reacções alérgicas que usualmente se seguem à administração de qualquer proteína estranha com estas dimensões.

Originalmente os requerentes descobriram uma região específica de hirudina que era responsável, pelo menos em parte, pela sua actividade anticoagulante. Sintetizou-se quimicamente a região peptídica (do resíduo de aminoácidos 55 ao 65 de hirudina) que demonstrou ligar-se ao sítio de reconhecimento da trombina sendo o sítio de reconhecimento espacialmente distinto do sítio de clivagem enzimática. A ligação dos péptidos de síntese também demonstrou evitar, de um modo competitivo, a ligação do fibrinogénio ao sítio de reconhecimento da trombina, um pré-requisito importante para a produção da fibrina e formação do coágulo, sendo, por esse motivo, de potencial valor, no campo médico, como anticoagulante.

Os requerentes prepararam, agora, determinada iodotirosina e marcaram radioisotopicamente os derivados de tirosina deste péptido. A presente invenção proporciona um método para a marcação radioactiva dos péptidos de hirudina que conserva presente a actividade do sítio de ligação. De acordo com a presente invenção, os péptidos de iodotirosina e os derivados radioisotópicos conservam, também, os seus atributos intrínsecos como anticoagulantes e, podem, por esse motivo, funcionar como coadjuvantes com interesse do ponto de vista científico e terapêutico. De um modo específico, a capacidade para incorporar isótopos radioactivos de hidrogénio e de iodo no péptido e conservar a actividade biológica do péptido, proporciona um novo reagente importante nos ensaios e utilização farmacêutica dos anticoagulantes. Espera-se que estes reagentes sejam importantes nos estudos animais e bioquímicos, isto é, nos ensaios radioimunológicos, rastreio de fármacos agonistas e antagonistas, estudos de farmacocinéticos e de biodistribuição e de visualização de imagens para diagnósticos. Para além disso, a presença de iodotirosina ou dos seus radioisótopos pode tornar-se valiosa no desenvolvimento de fármacos e no ensaio de agentes antitrombóticos podendo possuir, os próprios derivados, uma maior potência e uma duração de acção mais prolongada.

SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO

Os derivados peptídicos de fórmula geral

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}A_5\text{-}A_6\text{-}A_7\text{-}A_8\text{-}A_9\text{-}A_{10}\text{-}Y$$

na qual

o símbolo **X** representa um resíduo amino terminal seleccionado de entre um átomo de hidrogénio ou um ou dois grupos alquilo com 1 a 10 átomos de carbono, um ou dois grupos acilo com 2 a 10 átomos de carbono, grupos carbobenziloxi ou t-butiloxi-carbonilo;

O símbolo $\mathbf{A}_1$ representa sequências de hirudina ou as suas variantes naturais ou as suas porções, uma ligação ou representa um péptido que contém de 1 a 11 resíduos de qualquer aminoácido;

O símbolo $\mathbf{A}_2$ representa entre zero e cinco resíduos de I-Tyr, [^{3}H-]Tyr, [^{125}]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, ou um aminoácido L-aromático se o símbolo A_9 contiver um aminoácido marcado radioactivamente;

O símbolo $\mathbf{A}_3$ representa Glu, Asp, Ala;

O símbolo $\mathbf{A}_4$ representa qualquer aminoácido;

O símbolo $\mathbf{A}_5$ representa Ile, Val, Leu, Nle, Ala ou Phe;

O símbolo $\mathbf{A}_6$ representa Pro, Hyp, Pip, DhPro, tiazolidina-4-carboxilato, Sar, NMePgl, ou D-Ala;

O símbolo $\mathbf{A}_7$ representa qualquer aminoácido;

O símbolo A_8 representa qualquer aminoácido;

O símbolo A_9 representa um aminoácido lipofílico seleccionado de entre Tyr, I-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{3}I]-Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, His, Ala e Pro ou representa um dipéptido que contenha pelo menos um destes aminoácidos ou quaisquer aminoácidos liopofílicos;

O símbolo A_{10} representa sequências de hirudina ou as suas variantes naturais ou as suas porções, uma ligação, ou representa um péptido que contenha entre 1 e 11 resíduos de qualquer aminoácido;

O símbolo **Y** representa um resíduo carboxi terminal seleccionado de entre os grupos OH, alcoxi C_1-C_8, amino, aminoácidos mono ou di-alquilo C_1-C_4 substituídos;

são úteis como agentes anticoagulantes para a visualização de imagens em diagnóstico, para a detecção e quantificação para fins de diagnóstico, num "kit", ou como um agente anticoagulante em que, pelo menos um dos substituintes, contém um radioisótopo.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA PRESENTE INVENÇÃO

Abreviaturas usuais, utilizadas ao longo da presente memória descritiva :

1) aminoácidos e o seu código de três letras, 2) aminoácidos não usuais e modificados e 3) substituintes terminais amino e carboxi:

4.

(1) : OS AMINOÁCIDOS E O SEU CÓDIGO DE TRÊS LETRAS

L-AMINOÁCIDOS	D-AMINOÁCIDOS
Ala - alanina	D-Ala - D-alanina
Arg - arginina	D-Arg - D-arginina
Asn - asparagina	D-Asn - D-asparagina
Asp - ácido aspártico	D-Asp - D-ácido aspártico
Cys - cisteína	D-Cys - D-cisteína
Gly - glicina	
Glu - ácido glutâmico	D-Glu - D-ácido glutâmico
Val - valina	D-Val - D-valina
Gln - glutamina	D-Gln - D-glutamina
His - histidina	D-His - D-histidina
Ile - isoleucina	D-Ile - D-isoleucina
Leu - leucina	D-Leu - D-leucina
Lys - lisina	D-Lys - D-lisina
Phe - fenilalanina	D-Phe - D-fenilalanina
Met - metionina	D-Met - D-metionina
Pro - prolina	D-Pro - D-prolina
Ser - serina	D-Ser - D-serina
Thr - treonina	D-Thr - D-treonina
Trp - triptofano	D-Trp - D-triptofano
Tyr - tirosina	D-Tyr - D-tirozina

(2) : AMINOÁCIDOS NÃO USUAIS E MODIFICADOS

Aba - ácido α-amino-n-butírico
pClPhe - para-cloro-fenilalanina
Cha - ciclo-hexilalanina
Chg - ciclo-hexilglicina

Hyp - hidroxiprolina

I-Tyr - 3-iodotirosina (3-I-Tyr), 5-iodotirosina (5-I-Tyr), 3,5-di-iodotirosina (3,5-diI-Tyr),

[^{3}H]-Tyr - [3-^{3}H]-tirosina([3-^{3}H]-Tyr), [5-^{3}H]-tirosina ([5-^{3}H]-Tyr), [3,5-di^{3}H]-tirosina ([3,5-di^{3}H]-Tyr).

[^{125}I]-Tyr - [5-^{125}I]-iodotirosina ([5-^{125}I]-Tyr), [3-^{125}I]-iodotirosina ([3-^{125}I]-Tyr), [3,5-di^{125}I]-di-iodotirosina ([3,5-di^{125}I]-Tyr),

[^{131}I]-Tyr - [3-^{131}I]-tirosina ([3-^{131}I]-Tyr), [5-^{131}I]-tirosina ([5-^{131}I]-Tyr), [3,5-di^{131}I]-tirosina ([3,5-di^{131}I]--Tyr).

3,5-diI-Tyr - 3,5,-di-iodotirosina.

YMeGlu - D-éster gama metílico de ácido glutâmico

NMePhe - N-metilfenilalanina

NMePgl - N-metilfenilglicina

Npa - β-(naftil)alanina

DhPro - 3,4-di-hidroprolina

pNO$_2$Phe - para-nitro-fenilalanina

pCPhe - para-cloro-fenilalanina

Nle - norleucina

Orn - ornitina

Pip - pipecolato

Pba - ácido p-aminofenilbutírico

pSubPhe - fenilalanina para substituída

Pgl - fenilglicina

Sar - sarcosina (N-metilglicina)

SubPhe - fenilalanina orto, meta ou para mono ou di-substituída

Tha - β-(2-tienil)-alanina

Tiq - 3-carboxilato de tetra-hidroisoquinolina

SUBSTITUINTES ÁCIDOS AMINO E CARBOXI TERMINAIS

Ac - acetilo

Azt - azetidina-2-carboxilato

Cin - cinamoílo

DhCin- 3,4-di-hidrocinamoílo

Glt - glutarilo

Mal - maleilo

Oac - ácido 8-amino-octanoico

Oct - n-octilo

Suc - succinilo

Glt - glutarilo

Tfa - trifluoroacetilo

- amida C-terminal

O a seguir exposto, refere a listagem sequencial das variantes de aminoácidos naturais conhecidas de hirudina :

LISTAGEM SEQUENCIAL

VARIANTES DA SEQUÊNCIA AMINOÁCIDA DE HIRUDINA

1 5 10 15

Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu

Ile Thr



20 25 30

Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile Leu

Lys

35 40 45

Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr

Asn Lys Gly

Gln Asp

50 55 60

Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro

Asn Glu Asn

Gln

65

Glu Glu Tyr Leu Gln

Asp Asp Glu

(Ala^{63} Tyr^{64} Leu/Asp^{65} Glu^{66})

DEFINIÇÕES DA PRESENTE INVENÇÃO

Os aminoácidos naturais, com excepção de glicina, contêm um átomo de carbono qurálico. Salvo indicação em contrário, os aminoácidos ópticamente activos, a que aqui se faz referência, possuem a configuração L. Por exemplo, qualquer um dos aminoácidos dos grupos A_1 ou A_{10} podem possuir a configuração D ou a configuração L. Tal como habitual, a estrutura dos péptidos aqui designada, encontra-se disposta de tal modo que a extremidade amino-terminal se encontra do lado esquerdo da cadeia e a extremidade carboxi terminal encontra-se do lado direito da cadeia.

Considera-se que qualquer grupo alquilo e a porção alquilo de um grupo alcoxi engloba grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada ou cíclicos, como por exemplo, grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, ciclopentilo, hexilo, iso-hexilo, ciclo-hexilo, e ciclopentilmetilo, heptilo, octilo (Oct), ácido 8-amino-octanoico (Oac). Considera-se que um grupo acilo de 2 a 10 átomos de carbono inclui grupos acilo de cadeia linear, ramificada, cíclicos, saturados ou insaturados que possuem, 1 ou 2 radicais carbonilo por grupo, por exemplo, acetilo (Ac), azetidina-2-carboxilato (Azt), benzoil-succinilo, cinamoilo (Cin), 3,4-di-hidrocinamoilo (3,4-di-hidroCin), maleilo (Mal) e glutarilo (Glt). Consideram-se que os substituintes dos grupos alquilo e acilo incluem átomos de halogéneo, em que o grupo halogéneo representa os grupos fluoro, cloro, bromo ou iodo, por exemplo, trifluoro-acetilo (Tfa).

Os termos "qualquer aminoácido", tal como aqui se utiliza, não têm como intenção abranger qualquer ácido carboxílico que possua um substituinte amino, mas utiliza-se de preferência, tal como se utiliza habitualmente pelos especialistas de derivados polipeptídicos e incluem os aminoácidos naturais assim como outros α-aminoácidos "não-proteicos" vulgarmente utilizados pelos especialistas da química peptídica quando preparam análogos de síntese de péptidos naturais. Os aminoácidos naturais, são os aminoácidos de configuração L, glicina, alanina, valina, leucina,

isoleucina, serina, metionina, treonina, fenilalanina, tirosina, triptofano, cisteína, prolina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, arginina, ornitina e lisina. Também se encontra incluído como "qualquer aminoácido" os isómeros de configuração D ("D-aminoácidos") dos aminoácidos naturais; D-alanina, D-valina, D-leucina, D-isoleucina, D-serina, D-metioniona, D-treonina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-triptofano, D-cisteína, D-prolina, D-histidina, ácido aspártico, D-asparagina, ácido D-glutâmico, D-glutamina, D-arginina. Também se encontram incluidos os α-aminoácidos "não-proteicos" cujos exemplos são norleucina, norvalina, aloisoleucina, homoarginina, tiaprolina, di-hidroprolina, hidroxiprolina (Hyp), homosserina, ciclo-hexil-glicina (Chg), ácido α-amino-n-butírico (Aba), ciclo-hexilalanina (Cha), ácido aminofenilbutírico, fenilalaninas mono ou di-substituidas nas posições orto, meta ou para, tal como fenilalanina substituída na posição para (pSubPhe) e para-cloro-fenilalanina e para-nitro-fenilalanina (pNPhe) ou mais posições do grupo fenilo por um ou dois dos substituintes que se seguem: átomos de halogéneo ou grupos alquilo C_1-C_4 alcoxi C_1-C_4, nitro, ou substituído por um grupo metilenodioxi, β-2- e 3-tienilalanina, β-2 e 3-furanilalanina, β-2-, 3- 4-piridilalanina, β-(benzotienil-2 e 3-il)-alanina, β-(1- e 2- naftil)-alanina (Npa), derivados O-alquilados de serina, treonina ou tirosina, ésteres metílicos do ácido aspártico ou do ácido glutâmico, cisteína S-alquilada, ésteres de O-sulfato de tirosina e tirosinas halogenadas tais como 3-iodotirosina, 5-iodotirosina, 3,5-di-iodotirosina.

A expressão "aminoácidos marcados radioactivamente" inclui 3-[H^3]-tirosina, 5-[H^3]-tirosina, 3-[I^{125}]-iodotirosina, 5-[I^{125}]--iodotirosina, 3,5-[I^{125}]-di-iodotirosina, 3-[I^{131}]-iodotirosina, 5-[I^{131}]-iodotirosina e 3,5-[I^{131}]-di-iodotirosina. Com a expressão "sequências de hirudina ou as suas variantes naturais" os requerentes pretendem designar as sequências aminoácidas que descobriram para a hirudina, existentes na natureza.

Os termos "suas porções" utilizados em relação à hirudina e às suas variantes significam uma região consecutiva de pelo menos 4 aminoácidos derivados da sequência de hirudina ou das suas variantes.

Os termos "aminoácido lipofílico" incluem Tyr, Phe, Leu, Met, Nle, Ile, Val, e Pro. Os termos "aminoácido L-aromático" referem-se a tirosina e fenilalanina e aos aminoácidos que contenham um anel aromático.

Com a expressão "um péptido que contenha 1 a 11 resíduos de aminoácidos" pretende-se reflectir que a adição de aminoácidos quer ao grupo amino terminal quer ao grupo carboxi terminal do núcleo de aminoácidos (A_2-A_9) abrange a estrutura do núcleo com a sua actividade intrínseca.

A expressão "zero a cinco resíduos de I-Tyr, [H^3]-Tyr, [^{131}I]-Tyr[^{125}I]-Tyr", inclui as sequências que contêm um a cinco

resíduos de qualquer aminoácido que contenha I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr ou [^{131}I]-Tyr, de um modo singular, múltiplo ou em combinação com qualquer outro aminoácido. Também se encontram incluídos nesta definição de I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr ou os análogos posicionais correspondentes, tais como 3-iodotirosina, 5-iodotirosina, 3,5-di-iodotirosina, [3-^{3}H]-tirosina, [5-^{3}H]-tirosina, [3-^{125}I]-iodotirosina, [3-^{125}I]-iodotirosina, [5-^{125}I]-iodotirosina, [3,5-di-^{125}I]-di-iodotirosina, [3-^{131}I]-tirosina, [5-^{131}I]-tirosina e [3,5-di^{131}I]-tirosina. Poderá ser, por exemplo, uma sequência conhecida que contenha um a cinco resíduos de qualquer aminoácido contendo I-Tyr, [^{3}H]Tyr, [^{125}I]-Tyr, ou [^{131}I]-Tyr, de um modo singular ou múltiplo ou em combinação com qualquer outro aminoácido; Suc I-Tyr I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha yMeGlu, (exemplo#3) ou a inserção de aminoácidos, antes, entre, ou depois das sequências dipeptídicas ITyr ITyr ou em combinação com as mesmas.

Outros exemplos de moléculas marcadas radioactivamente que se podem ligar à hirudina, de acordo com a presente invenção, incluem as moléculas radio-halogenadas. Os halogéneos radioactivos úteis para a visualização de imagens em diagnóstico, incluem, mas não se limitam a ^{125}I e ^{123}I, para visualização observando o paciente com uma câmara gama, e ^{18}F, ^{75}Br, ou ^{76}Br para visualização tomográfica positrónica.

Os polipéptidos de fórmula geral 1 podem formar sais aceitá-

veis sob o ponto de vista farmacêutico com qualquer ácido não-tóxico, orgânico ou inorgânico. Exemplos de ácidos inorgânicos que formam sais adequados incluem o ácido clorídrico, o ácido bromídrico, o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico e os sais de metais ácidos tais como o mono-hodrogeno-ortofodfato de sódio ou o hodrogeno-sulfato de potássio. Exemplos de ácidos orgânicos que formam sais adequados incluem os ácidos mono, di, e tricarboxílicos. Constituem exemplos de tais ácidos, por exemplo, os ácidos acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroxi-maleico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinâmico, salicílico, 2-fenoxibenzoico ou sulfónicos, tais como o ácido metano-sulfónico e o ácido 2-hidroxietano-sulfónico. Os sais da porção aminoácida carboxi terminal incluem os sais de ácidos carboxílicos não tóxicos formados com qualquer base orgânica ou inorgânica adequada. De um modo exemplificativo, estes sais incluem os de metais alcalinos, como por exemplo, de sódio e de potássio; os de metais alcalino-terrosos, tais como os de cálcio e magnésio; os sais de metais leves do Grupo IIIA, incluindo o alumínio; e de aminas orgânicas primárias, secundárias ou terciárias, como por exemplo, trialquilaminas, incluindo trietilamina, procaína, dibenzilamina, 1-etenamina, N,N'-dibenzil-etilenodiamina, di-hidroabietilamina, N-alquil-(inferior)-piperidina e de quaisquer outras aminas adequadas.

Tal como acontece com qualquer grupo genérico de compostos

químicos, dá-se preferência a determinados grupos. Os requerentes preferem os derivados peptídicos de fórmula geral 1 em que

o símbolo **X** representa um átomo de hidrogénio ou um grupo acetilo ou succinilo;

o símbolo A_1 representa sequências de hirudina ou as das suas variantes naturais, inclusive, dos aminoácidos 1 a 54 ou as suas regiões, ou uma ligação;

o símbolo A_2 representa de um a cinco resíduos de I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, ou Trp, Glu, His, Leu, Phe, D-Phe, SubPhe, NMePhe, Tha, 3,4-DhCin, Cin, Nap, β-(2- e 3-tienil)alanina, β-(2- e 3-furanil)alanina, β-(2-, 3-, e 4-piridil)alanina, β-(benzotienil-2 e 3-il)alanina ou β-(1- e 2-naftil)alanina;

o símbolo A_3, representa Glu, Ala;

o símbolo A_4 representa Glu, Asp, Pro ou Ala, Azt, ou Pip;

o símbolo A_5 representa Ile, Leu;

o símbolo A_6 representa Pro, Sar, D-Ala, Hyp ou NMePgl;

o símbolo A_7 representa Glu, Gln, Asp ou Ala;

o símbolo A_8 representa Glu, Asp ou Ala;

o símbolo A_9 represente I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, ou Tyr, Ala, Pro, Cha, ou os dipéptidos, Ala-Tyr, Tyr-Leu, Ala-Phe, Tyr-Tyr, Ala-Leu, Tyr-Ala, Glu-Leu, D-Tyr-Leu, Leu-Phe, Sar-Cha, Pro-Cha, Cha-Leu, Ala-Cha, Tyr-Cha;

o símbolo A_{10} represente uma ligação, ou yMeGlu, Glu, D-Glu, Asn, D-Asn, Pro, Gln, Ala, Lys, D-Lys, Asp, Orn, Asp, ou Ala; e

o símbolo **Y** represente um resíduo carboxi terminal seleccionado entre grupos OH, alcoxi C_1-C_8, amino, aminoácidos mono ou di-alquilo C_1-C_4 substituídos.

Dá-se especial preferência aos derivados peptídicos de fórmula geral 1, em que

o símbolo **X** represente succinilo;

o símbolo A_1 represente uma ligação;

o símbolo A_2 represente I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr ou [^{131}I]-Tyr;

o símbolo A_3 represente Glu;

o símbolo A_4 represente Glu ou Pro;

o símbolo A_5 represente Ile;

o símbolo A_6 represente Pro;

o símbolo A_7 represente Glu;

o símbolo A_8 represente Glu ou Asp;

o símbolo A_9 represente Ala-Cha;

o símbolo A_{10} represente yMeGlu, e

o símbolo **Y** represente o grupo OH.

SÍNTESE :

Podem preparar-se as proteínas da presente invenção, de acordo com diversos procedimentos conhecidos na especialidade. Tais procedimentos incluem síntese de péptidos em fase solúvel, síntese sequencial em fase sólida e síntese em bloco; a clonagem de genes e as combinações destas técnicas. Pode levar-se a efeito o procedimento sequencial em fase sólida utilizando métodos automatizados estabelicidos tal como a utilização de um sintetizador de péptidos automatizado. Neste procedimento, constroem-se os péptidos sobre resina, iniciando-se com aminoácido C-terminal protegido. O suporte de resina empregue pode ser qualquer uma das resinas que se utilizam convencionalmente para a preparação em fase sólida de polipéptidos, de preferência, poliestireno, que se ligou de modo reticular com 0,5 a cerca de 3 por cento de divinil-benzeno, que se clorometilou ou hidroximetilou para se obterem sítios para a formação de ésteres com o aminoácido protegido em α-amino inicialmente introduzido. Para as amidas C-terminais, pode utilizar-se uma resina de primetilbenzil-hidroxilamina. Após ter-se completado o acoplamento, da sequência ou se remove o

grupo Boc ou se conserva no mesmo local ou se remove o grupo Boc e se efectua a acilação do grupo amino terminal. Efectua-se o deslocamento do fragmento protegido da resina utilizando um amino--álcool adequado.

Encontra-se descrito por Bodanszky e outros, "Chem. Ind."; (London); 38; 1966; p. 1957-98, um exemplo de uma resina de hidroximetilo. Encontra-se comercialmente disponível uma resina clorometilada nos Bio Rad Laboratories, Richmond, Califórnia e a preparação de tal resina encontra-se descrita por Stewart e outros, "Solid Phase Peptid Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), Capítulo 1, p. 1-6. Pode ligar-se o aminoácido protegido à resina de acordo com o procedimento de Gisin, "Helv. Chem Acta"; 56; 1973; p. 1476. Encontram-se comercialmente disponíveis diversas resinas ligadas a aminoácidos protegidos. A título de exemplo, para se preparar um polipéptido da presente invenção em que o grupo carboxi terminal consiste num resíduo de D-Glu, pode utilizar-se um D-Glu protegido por um grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc) ligado a uma resina de fenilacetamidometilo (PAM), benzilada, hidroximetilada.

A seguir ao acoplamento do aminoácido protegido em α-amino, ao suporte de resina, elimina-se o grupo de protecção utilizando qualquer um dos procedimentos adequados tal como utilizando ácido trifluoroacético em cloreto de metileno, apenas ácido trifluoroacético ou HCl em dioxano. Efectua-se a desprotecção a uma tempe-

ratura compreendida entre 0°C e a temperatura ambiente. Podem utilizar-se outros reagentes e condições de clivagem normalizados para a eliminação de grupos específicos de protecção, α-amino. Após a eliminação do grupo de protecção α-amino ligaram-se os outros aminoácidos protegidos pelo grupo amino, passo a passo, segundo a ordem desejada. Como alternativa, podem acoplar-se grupos aminoácidos múltiplos de acordo com o método de solução antes de se acoplarem à sequência aminoácida suportada pela resina.

O grupo de protecção α-amino utilizado em cada aminoácido introduzido na sequência polipeptídica pode ser qualquer um dos grupos de protecção conhecidos na especialidade. Entre as classes de grupos de protecção α-amino contempladas encontram-se os grupos de protecção (1) de tipo acilo tais como : grupos formilo, trifluoroacetilo, ftalaílo, toluenossulfonilo (tosilo), benzenossulfonilo, nitrofenilsulfenilo, tritilsulfenilo, o-nitrofenoxiacetilo e α-clorobutirilo; (2) grupos de protecção aromáticos de tipo uretano tais como os grupos benziloxicarbonilo e benziloxicarbonilo substituído, tais como os grupos p-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenzil-carbonilo, p-bromobenziloxicarbonilo, p-metoxi benziloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α-dimetil-3,5-dimetiloxibenziloxicarbonilo e benzidriloxicarbonilo; (3) grupos de protecção de tipo uretano alifáticos tais como os grupos terc-butiloxicarbonilo (Boc), di-isopropilmetoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, etoxicarbonilo e aliloxicarbonilo; (4) grupos

de protecção cicloalquílicos de tipo uretano, tais como os grupos ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo e ciclo-hexiloxi-carbonilo; (5) grupos de protecção de tipo tiouretano tal como o grupo feniltiocarbonilo; e (6) grupos de protecção de tipo alquilo, tais como trifenilmetilo (tritilo) e benzilo. O grupo de protecção α-amino, preferencial é o grupo terc-butiloxicarbonilo.

Como é do conhecimento da técnica de síntese de péptidos em fase sólida, muitos dos aminoácidos englobam funcionalidades que necessitam de protecção durante a preparação da cadeia. A utilização e selecção dos grupos de protecção adequados é da competência do especialista e dependerá do aminoácido que se pretenda proteger e da presença, no péptido, de outros resíduos aminoácidos protegidos. A selecção de um tal grupo de protecção de cadeia lateral é crítica devido ao facto de ter de ser um grupo que não seja eliminado pela clivagem durante a clivagem do grupo de protecção do radical α-amino. Os grupos de protecção de cadeia lateral apropriados para a lisina, são, por exemplo, o grupo benziloxicarbonil e o grupo benziloxicarbonilo substituído, sendo o referido substituinte seleccionado entre átomos de halogéneo (como por exemplo, os átomos de cloro, bromo, fluoro) ou o grupo nitro (como por exemplo os grupos 2-clorobenziloxicarbonil, p-nitrobenziloxi-carbonilo, 3,4-diclorobenziloxicarbonilo), grupos tozilo, t-amiloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo e di-isopropil-metoxicarbonilo. Podem protejer-se também os grupos hidroxilo alcoólicos da trionina e da serina com um grupo acetilo, um grupo

benzoílo, um grupo terc-butilo, um grupo tritilo, um grupo benzilo, um grupo 2,6-diclorobenzilo ou um grupo benziloxicarbonilo. O grupo de protecção preferencial é o grupo benzilo.

A selecção de um agente de acoplamento adequado é da competência do especialista. Os agentes de acoplamento adequados, quando o aminoácido que se pretende adicionar é Gln, Asn ou Arg, são os compostos N,N'-di-isopropilcarbodi-imida e 1-hidroxibenzotriazol. A utilização destes agentes evita a formação de nitrilo e lactama. Outros agentes de acoplamento são : (1) carbodi-imidas (como por exemplo N,N'-diciclo-hexilcarbodi-imida e N-etil-N'-(γ-dimetilaminopropilcarbodi-imida); (2) cianamidas (como por exemplo, N,N-dibenzilcianamida); (3) ceteniminas; (4) sais de isoxazólio (como por exemplo N-etil-5-fenil-isoxazólio-3'-sulfonato; (5) amidas heterocíclicas contendo azoto monocíclico de características aromáticas contendo um a quatro átomos de azoto no anel, tal como as imidazolidas, as piazolidas e 1,2,4-triazolidas. As amidas heterocíclicas específicas úteis abrangem N,N'-carbonildi-imidazol e N,N-carbonil-di-1,2,4-triazol; (6) acetileno alcoxilado (como por exemplo etoxiecetileno); (7) reagentes que formam um anidrido misto com o radical carboxilo do aminoácido (como por exemplo etilcloroformato e isobutilcloroformato ou o anidrido simétrico do aminoácido que se pretende acoplar (por exemplo Boc-Ala-O-Ala-Boc), (8) compostos heterocíclicos que contêm azoto e que possuem um grupo hidroxi num anel de azoto (como por exemplo N-hidroxiftalimida, N-hidroxissuccinimida ou

N-hidroxibenzotriazol) e (9) o reagente de Castro (BOP). Kapoor e outros, "J. Pharm. Sci."; 59; 1970, p. 1-27 descreveram outros reagentes de activação e a sua utilização no acoplamento de péptidos. Os requerentes dão preferência à utilização do anídrico simétrico como reagente de acoplamento para todos os aminoácidos, com excepção de Arg, Asn e Gln.

Introduziu-se cada um dos aminoácidos protegidos ou cada uma das sequências aminoácidas no reactor de fase sólida num excesso de aproximadamente quatro vezes e efectuaram-se os acoplamentos num meio de dimetilformamida:cloreto de metileno (1:1) ou apenas em dimetilformamida ou, de preferência, em apenas cloreto de metileno. Nos casos em que surgiram acoplamentos incompletos, repetiu-se o procedimento de acoplamento antes de se eliminarem os grupos de protecção α-amino, antes de se efectuar o acoplamento do aminoácido seguinte, no reactor de fase sólida. Monitorizou-se a efectivação da reacção de acoplamento, em cada uma das fases de síntese, pela reacção da ninidrina, tal como descrito por E. Kaiser e outros, "Analyt. Biochem."; 34; 1970; p. 595. A seguir ao acoplamento do aminoácido α-amino protegido, com o suporte de resina, elimina-se o grupo de protecção utilizando qualquer um dos procedimentos adequados, por exemplo utilizando ácido trifluoroacético em cloreto de metileno, ácido trifluoroacético sozinho ou HCl em dioxano. Efectua-se a desprotecção a uma temperatura compreendida entre $0^{o}C$ e a temperatura ambiente. Podem utilizar-se outros reagentes e condições de clivagem norma-

lizados para a eliminação de grupos específicos de protecção α-amino. Após eliminação do grupo de protecção α-amino acoplaram-se passo a passo os outros aminoácidos protegidos, pela ordem desejada. Como alternativa, podem acoplar-se grupos múltiplos de aminoácidos de acordo com o método de solução antes de se efectuar o acoplamento à sequência aminoácida suportada pela resina.

Após ter-se obtido a sequência aminoácida desejada, elimina-se o péptido da resina e desproteje-se. Pode efectuar-se esta operação por hidrólise, como por exemplo, por tratamento do polipéptido ligado à resina com HF líquido anidro na presença de agentes de limpeza (como por exemplo anisol). Usualmente, efectua-se a eliminação dos grupos de protecção, após a síntese da cadeia peptídica se encontrar completa, mas podem eliminar-se os grupos de protecção em qualquer altura adequada.

Leva-se a efeito a purificação e análise dos péptidos desprotegidos de acordo com diversos procedimentos normalizados. A selecção dos procedimentos de purificação e análise adequados é da competência do especialista. Um procedimento de purificação adequado consiste na CLEP preparatória. Pode efectuar-se a análise dos péptidos purificados por CLEP analítica, análise aminoácida, espectometria de massa por bombardeamento com átomos rápidos e quaisquer outros meios de análise adequados.

PÉPTIDOS MARCADOS RADIOACTIVAMENTE :

Os péptidos marcados radioactivamente, da presente invenção, são úteis para determinações, in vitro e in vivo, de trombina e de complexos de trombina tanto na pesquisa como na terapia ou em conjuntos de ensaio ou de diagnóstico dos mesmos, para a preparação de agentes de ligação à trombina marcados radioactivamente. Um dos aspectos da presente invenção consiste na marcação radioactiva de péptidos que se ligam à trombina e que também reduzem ou eliminam a actividade trombolítica da trombina, podendo servir para estabilizar tais complexos. Um exemplo de tal facto poderia ser a visualização da imagem, por meios da imagem radioactiva dos trombos incorporada nos coágulos. A ligação do péptido de hirudina ligado à trombina permitiria a determinação da localização e distribuição dos trombos de acordo com técnicas de visualização de radioimagens.

Efectua-se, geralmente a radio-iodação de péptidos utilizando o método da cloramina T. Os métodos alternativos ao método de cloramina T para a marcação de péptidos, incluem; (1) o método de monocloreto de iodo, (2) os métodos alternativos de oxidação química; (3) a iodação electrolítica e (4) os métodos de iodação enzimática. Como alternativa (5), são bem conhecidos dos especialistas, os métodos de conjugação de marcação radioactiva, para a iodação de proteínas e de polipéptidos, utilizando 3-(4-hidroxi--5-[^{125}I]-iodofenil)-propionato de N-succinimidilo (reagente de

Bolton)-Hunter ou outro método de marcação radioactiva adequado. Por exemplo, utilizou-se, cloridrato de p-hidroxibenzimidato de metilo como reagente de iodação uma vez que possui anilinas diazotizadas radioiodadas. Pode efectuar-se a conversão dos péptidos iodados em péptidos que contêm trítio, utilizando redução catalítica com óxido de paládio e gás de trítio.

UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA :

A dose anticoagulante de um derivado peptídico da presente invenção encontra-se compreendida entre 0,2 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal do doente por dia, dependendo do doente, da gravidade da situação trombótica que se pretende tratar e do derivado peptídico seleccionado. Pode determinar-se facilmente a dose adequada para um dado doente. De um modo preferencial, administrar-se-ão, habitualmente de 1 a 4 doses diárias com aproximadamente 5 mg a 100 mg de ingrediente activo, por dose. Pode ser facilmente determinada, pelo especialista,a quantidade de um péptido da presente invenção necessária para inibir ou evitar a coagulação sanguínea num meio extracorporal tal como sangue total armazenado.

A terapia anticoagulante é indicada para o tratamento e prevenção de diversas situações trombóticas, especialmente nas doenças das artérias coronárias e cerebrovasculares. Os especialistas neste campo determinarão facilmente as circunstâncias em

que é necessária a terapia anticoagulante. O termo "doente" aqui utilizado refere-se a mamíferos tais como primatas, incluindo seres humanos, caprinos, equinos, gado, suínos, caninos, gatos, ratazanas e ratos. A inibição da coagulação sanguínea é útil não apenas na terapia anticoagulante de indivíduos que padecem de situações trombóticas, mas é também útil sempre que se pretenda uma coagulação sanguínea, tal como para evitar a coagulação do sangue total, armazenado e para evitar a coagulação em outras amostras biológicas para ensaio ou armazenamento.

Embora alguns derivados peptídicos possam penetrar através dos intestinos, após administração oral, os requerentes preferem a administração não oral, por exemplo a via subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal; a administração por injecção de libertação constante; a administração por preparação de uma implantação; ou por aplicação às membranas mucosas, tais como a do nariz, da garganta, da árvore brônquica, por exemplo num aerossol que contenha o derivado peptídico da presente invenção sob a forma de uma aspersão ou de um pó anidro.

Podem administrar-se os compostos, por administração parentérica, sob a forma de dosagens injectáveis de uma solução ou suspensão do composto num diluente fisiologicamente aceitável com um veículo farmaceuticamente aceitável que pode ser um líquido esterilizado, tal como a água e óleos, com ou sem adição de um tensioactivo e de outros coadjuvantes farmaceuticamente

aceitáveis. Como exemplos de óleos que se podem utilizar nestas preparações, referir-se-ão os óleos de petróleo, os óleos animais, os óleos vegetais, os óleos de origem de síntese, como por exemplo o óleo de amendoím, o óleo de soja e o óleo mineral. Os veículos líquidos preferenciais, especialmente para soluções injectáveis são, geralmente, a água, a solução salina, a dextrose aquosa, e soluções de açúcares que lhe estão associados, etanol e glicóis tais como propileno-glicol ou polietileno-glicol.

Podem administrar-se os compostos sob a forma de uma injecção de libertação constante ou de uma preparação para implantação que se pode formular de tal modo que permita uma libertação controlada do ingrediente activo. Pode comprimir-se o ingrediente activo em comprimidos ou pequenos cilindros e implantar-se subcutaneamente ou intramuscularmente sob a forma de injecções ou de implantações de libertação constante. Nas implantações podem utilizar-se materiais inertes tais como polímeros biodegradáveis ou silicones sintéticos, como por exemplo, "Silastic", borracha de silicone, fabricada pela Down-Corning Corporation.

EXEMPLOS

A presente invenção encontra-se ilustrada pelos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1

SÍNTESE DE Suc 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu.

Efectuou-se a síntese de Suc 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Ala Cha D-Glu, de acordo com métodos de fase sólida num sintetizador de péptidos ABI 430A. Adicionou-se sequencialmente anidridos simétricos previamente formados de aminoácidos Nα-Boc protegidos, a resina de Merrifield Boc-glu(Bzl) (0,34 meq/gm) utilizando protocolos de acoplamento duplos fornecidos pela ABI. Utilizou-se a seguinte protecção de cadeia lateral : 3,5-diI-Tyr (3-Br-Bzl); Glu(Bzl). Efectuou-se a succinilação da extremidade N do péptido ligado à resina com anidrido succínico.

Clivou-se o péptido da resina com HF anidro @ 0°C, durante 30 minutos, na presença de anizol. Extraíu-se o péptido com HoAc, a 5%, H_2O, CH_3CN a 30% e liofilizou-se. Purificou-se o material liofilizado por CLEP de fase inversa utilizando uma coluna "Beckman Ultraprep C-18" (50,8 x 150 mm) @ 80 ml/minuto, com um gradiente de 30-40% de CH_3CN/TFA em solução aquosa.

Efectuou-se a iodação directa dos péptidos de hirudina com Na[^{125}I]. De um modo geral, efectuou-se a iodação de 50 μg do péptido de hirudina (2 mg/ml) em fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,5) pela adição de 10 μl de Cloramina T (1,25 mg/ml em tampão fosfato 0,5 M). Deixou-se prosseguir a reacção durante 30 s a 24°C. Depois pôs-se termo à reacção adicionando 25 μl de metabi-sulfureto de

sódio (1,25 mg/ml em tampão fosfato 0,5 M). Aplicou-se imediatamente a mistura reaccional de iodação a uma coluna bio-gel P-2 (2,6 x 50 cm) equilibrada com um tampão de burato de sódio 0,1 M, a pH 8,5. Transferiram-se aproximadamente 85% das moléculas marcadas com [^{125}I] para as proteínas, de acordo com a determinação efectuada por cromatografia em coluna. Depois, adicionaram-se imediatamente, os péptidos de hirudina marcados, à albumina de soro de feto de bovino a 1% e ao tampão de burato de sódio 0,1 M (1:1) e armazenou-se a -20°C em diversos frascos. Utilizou-se em cada um dos ensaios uma amostra recentemente descongelada de hirudina marcada. Após armazenamento, a cromatografia dos péptidos de hirudina marcados CLEP em coluna TKS-3000 proporcionou um único pico de radioactividade que coincidiu com o perfil de eluição dos péptidos de hirudina não marcados.

Trituraram-se por redução catalítica os péptidos de hirudina. Efectuou-se uma suspensão de cinquenta mg de péptido em 2 ml de H_2O e em 30 µl de trietilamina. Adicionou-se a esta solução 30 µg de óxido de plátio-alumínio. Efectuou-se a redução atmosférica à temperatura ambiente, durante 1 hora. Lavaram-se inicialmente as misturas reaccionais com H_2O para eliminar o material de marcação não incorporado e efectuou-se novo isolamento do material impuro resultante. (Ver Dupont-NEN Research Catalog p. 22, Cat. #8259, Catalytic Reduction com óxido de plátio).

A análise dos péptidos marcados purificados proporcionou os

picos de iões moleculares desejados por EM-BAR e possuía uma análise aminoácida que se encontrava em concordância com o péptido desejado. Deste modo, os péptidos seguintes possuem as propriedades físicas que adiante se especificam.

Ensaiaram-se as amostras num ensaio de inibição de formação de coágulo de fibrina induzida pela trombina. Prepararam-se todas as soluções que se utilizaram no ensaio, com tampão de ensaio contendo cloreto de sódio 0,12 M, de fosfato de sódio 0,01 M, azida de sódio a 0,01% e de albumina de soro de bovino a 0,1%, a pH 7,4. Titulou-se a trombina de bovino para uma concentração adequada, de modo a poder monitorizar-se a formação do coágulo de fibrina através de um leitor de placa de microtitulação (Bio-Tek EL 309), durante 60 minutos a 405 nm. Adicionou-se esta solução de trombina (50 μl; 0,2 pmol) aos tubos de uma placa de microtitulação contendo 50 μl de uma solução de péptido de síntese que se encontrava em ensaio. Após agitação, durante 1 minuto e uma incubação durante mais 10 minutos, a 24°C, adicionou-se 100 μl de plasma diluído (1:10) em EDTA a 0,1% e agitou-se em turbilhão durante 20 s. Monitorizou-se a turvação através do autoleitor a intervalos de 5 minutos. Calculou-se a CI_{50} a partir dos resultados e definiu-se como a concentração de péptido que conduz a 50% da turvação observado relativamente a um controlo que não continha inibidor. Isto é equivalente a um acréscimo duplo no tempo de formação do coágulo de fibrina. Para os ensaios em que se utilizou trombina humana ou de bovino, titulou-se a trombina

para concentrações que proporcionaram o coágulo de fibrina na mesma proporção durante um período de 30 minutos. Deste modo, os péptidos que se seguem, possuem as propriedades biológicas que se especificam a seguir em que + representa uma CI_{50} compreendida entre 25 μM e 200 μM e ++, representa uma $CI_{50} < 25\ \mu$M, e nt significa "não determinada".

1) Suc 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1582 EM-BAR $(MH)^+$ 1581

Análise aminoácida:

Z(4)	Pro(2)	Ile(1)	Tyr(1)	Ala(1)
4,09	1,96	0,96	0,98	0,99

Potência in vitro: ++

2) Suc [^{3}H]-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1995 EM-BAR $(MH)^+$ 1996,3

Marcação e análise realizada em NEN

Potência in vitro: nt.

3) Suc 3,5-diI-Tyr 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1995 EM-BAR $(MH)^+$ 1996,3

Análise aminoácida:

Z(4)	Pro(2)	Ile(1)	Tyr(2)	Ala(1)
4,09	1,96	0,96	1,95	0,99

Potência in vitro: ++

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de derivados peptídicos radiomarcados de fórmula geral

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}A_5\text{-}A_6\text{-}A_7\text{-}A_8\text{-}A_9\text{-}A_{10}\text{-}Y$$

na qual:

X representa um resíduo amino-terminal seleccionado de entre um átomo de hidrogénio, um ou dois grupos alquilo com 1 a 10 átomos de carbono, um ou dois grupos acilo com 2 a 10 átomos de carbono, carbobenziloxi ou t-butiloxi-carbonilo;

A_1 representa sequências de hirudina ou suas variantes naturais ou suas porções, uma ligação, ou representa um péptido possuindo entre 1 e 11 resíduos de qualquer amino-ácido;

A_2 representa entre 0 e 5 resíduos de I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, ^{131}I]-Tyr, ou um aminoácido L-aromático se A_9 possuir um aminoácido radiomarcado;

A_3 representa Glu, Asp, Ala;

A_4 representa qualquer aminoácido;

A_5 representa Ile, Val, Leu, Nle, Ala, D-Leu ou Phe;

A_6 representa Pro, Hyp, Azt, Pip, DhPro, tiazolidina-4-carboxilato, Sar, NMePgl ou D-Ala;

A_7 representa qualquer aminoácido;

A_8 representa qualquer aminoácido;

A_9 representa um aminoácido lipofílico seleccionado de entre Tyr, I-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{3}H]-Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, His, Ala e Pro ou representa um dipéptido contendo pelo menos um destes aminoácidos ou quaisquer aminoácidos lipofílicos;

A_{10} representa sequências de hirudina ou as suas variantes naturais ou as suas porções, uma ligação, ou representa um péptido contendo entre 1 e 11 resíduos de qualquer aminoácido;

Y representa um resíduo carboxi terminal seleccionado de entre um grupo OH, alcoxi C_1-C_8, amino, aminoácidos substituídos por radicais mono- ou di-alquilo C_1-C_4, ou representa um resíduo álcool terminal;

ou um seu sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, caracterizado por:

a) se utilizar uma resina com um aminoácido protegido C-terminal ligado adequadamente a partir do grupo A_{10};

b) se ligar sequencialmente os outros aminoácidos protegidos α-amino, A_9 através de A_1, para proporcionar a sequência de aminoácidos protegida desejada;

c) se remover os referidos grupos protectores e se purificar o péptido desejado; e

d) se marcar o péptido com um rádio-halogéneo e se purificar o péptido marcado.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_2 representa I-Tyr, $[^3H]$-Tyr, $[^{131}I]$-Tyr ou $[^{125}I]$-Tyr, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_3 representa Glu, caracterizado por se utilizarem compostos ini-

ciais correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_4 representa Pro, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_5 representa Ile, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_6 representa Pro, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_7 representa Glu, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_8 representa Glu, caracterizado por se utilizarem compostos ini-

ciais correspondentemente substituídos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_9 representa Ala-Cha, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_{10} representa D-Glu, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual X representa um átomo de hidrogénio, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado peptídico de fórmula geral I na qual A_9 representa I-Tyr, $[^{3}H]$-Tyr, $[^{125}I]$-Tyr, $[^{131}I]$-Tyr, caracterizado por se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

Lisboa, 2 de Outubro de 1990
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS PEPTÍDICOS ANTICOAGULANTES RADIOMARCADOS"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de derivados peptídicos radiomarcados de fórmula geral

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}A_5\text{-}A_6\text{-}A_7\text{-}A_8\text{-}A_9\text{-}A_{10}\text{-}Y$$

a) utilizando-se uma resina com um aminoácido protegido C-terminal ligado adequadamente a partir do grupo A_{10};

b) ligando-se sequencialmente os outros aminoácidos protegidos α-amino, A_9 através de A_1, para proporcionar a sequência de aminoácidos protegida desejada;

c) removendo-se os referidos grupos protectores e purificando-se o péptido desejado; e

d) marcando-se o péptido com um rádio-halogéneo e purificando-se o péptido marcado.

Aplicação em farmácia como anticoagulantes.

Lisboa, 2 de Outubro de 1990
O Agente Oficial da Propriedade Industrial