

~~SECRET~~

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 996

REQUERENTE: FISONS CORPORATION, norte-americana, com sede em 755 Jefferson Road, Rochester, New York 14623, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de hexapéptidos com grupos éster sulfato e de composições farmacêuticas que os contêm"

INVENTORES: James Donald Rosamond

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

Estados Unidos da América em 27 de Novembro de 1989 sob o n.º 07/441.275

71 838
IR 3996A



PATENTE Nº 95 996

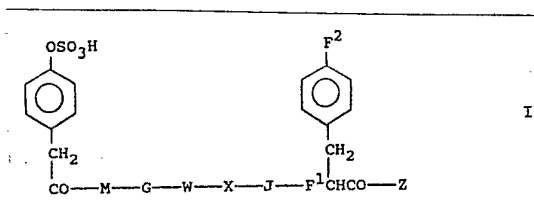
"Processo de preparação de hexa-
péptidos com grupos éster sulfato e
de composições farmacêuticas que os
contêm"

para que

FISONS CORPORATION, pretende obter
privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de
compostos de fórmula I:



em que

M é Met, DMet, MeMet, MetO, Ahx, DAhx, MeAhx, Leu, MeLeu,
Pro, Ile, MeIle, Ala ou Lys;

G é Gly, DAla, Pro, Ala, β Ala ou Sar;

W é Trp, MeTrp, Ala ou NaI;

X é Met, MeMet, MetO, Ahx, MeAhx, Leu, MeLeu, Pro, Ile,
MeIle, Ala ou Lys;

J é Asp, DAsp, MeAsp, Ala ou Asn;

F¹ é (S)-NH, (R)-NH, (S)-R¹N ou (R)-R²N;

F² é H, Cl, I, Br, F, NO₂, NH₂, R³ ou OR⁴;

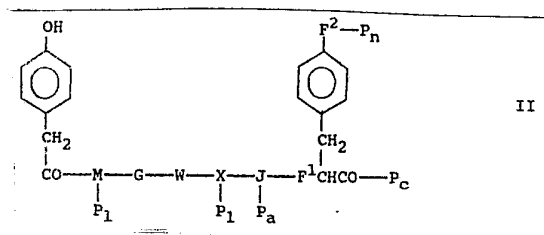
Z é NH₂, NHR⁵ ou NR⁵R⁶;

R¹, R², R³, R⁵ e R⁶ são alquilo C1 a 6; e

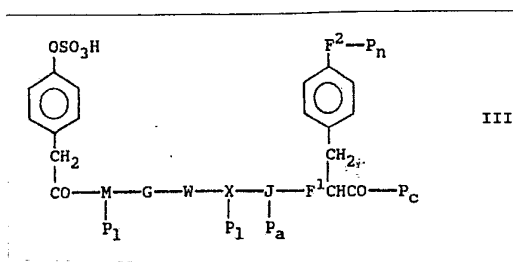


R⁴ é H ou alquilo C1 a 6,
e de seus sais farmacêuticamente aceitáveis.
O processo compreende:

a) sulfatar um composto de fórmula II:



b) remover um ou mais grupos protectores de um composto correspondente de fórmula III



e quando desejado ou necessário, converter o composto de fórmula I resultante num seu sal farmacêuticamente aceitável ou vice-versa.

Estes compostos são novos e são úteis como produtos farmacêuticos. Nomeadamente, são úteis no tratamento da obesidade e na estimulação da contracção da vesícula biliar.



MEMÓRIA DESCRITIVA

Hexapéptidos com grupos éster sulfato

Esta é uma continuação em parte do Pedido de Patente U.S. 07/441275 co-pendente, depositado em 27 de Novembro de 1989.

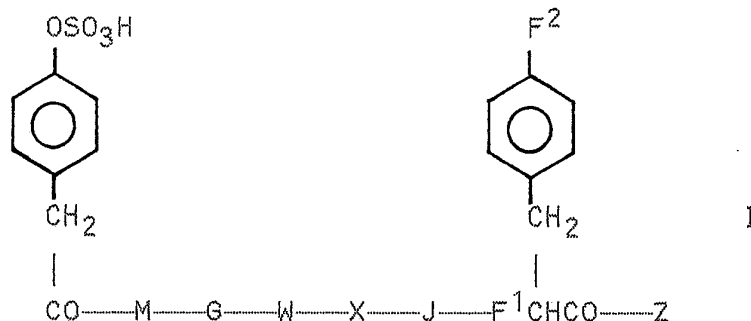
Este invento refere-se a hexapéptidos que contêm ésteres sulfato que possuem propriedades de inibição da alimentação e que são capazes de estimular a contração da vesícula biliar.

Antecedentes do invento

Estes péptidos têm seis aminoácidos. Todos diferem estruturalmente dos péptidos que se sabe terem propriedades de inibição da alimentação (eg CCK-8, que tem a estrutura: Asp-Tir(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-Asp-Fen-NH₂ e ceruletido, que tem a estrutura: Glp-Gln-Asp-Tir(SO₃H)-Tre-Gli-Trp-Met-Asp-Fen-NH₂. Os péptidos deste invento não se encontram na natureza tendo que ser sintetizados. Conhecem-se alguns péptidos que têm propriedades de inibição da alimentação, por exemplo os descritos nos Pedidos de Patente Europeia nº 86117612 e 87117096. Os péptidos do presente invento diferem desses em que a tirosina sulfatada do terminal N foi substituído por ácido hidroxifenilacético sulfatado.

Descrição pormenorizada

De acordo com o invento, proporciona-se um composto de fórmula I:



na qual

M é Met, DMet, MeMet, MetO, Ahx, DAhx, MeAhx, Leu, MeLeu, Pro, Ile, MeIle, Ala ou Lis;



G é Gli, DAla, Pro, Ala, β Ala ou Sar;

W é Trp, MeTrp, Ala, ou Nal;

X é Met, MeMet, MetO, Ahx, MeAhx, Leu, MeLeu, Pro, Ile, MeIle, Ala ou Lis;

J é Asp, DAsp, MeAsp, Ala ou Asn;

F¹ é (S)-NH, (R)-NH, (S)-R¹N ou (R)-R²N;

F² é H, Cl, I, Br, F, NO₂, NH₂, R³ ou OR⁴;

Z é NH₂, NHR⁵ ou NR⁵R⁶;

R¹, R², R³, R⁵ e R⁶ são alquilos C₁ a C₆; e

R⁴ é H ou alquilos C₁ a C₆,

e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

De acordo com o invento, também se proporciona um processo de prevenção ou de tratamento da obesidade que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um composto de fórmula I ou de um sal farmacologicamente aceitável deste, a um mamífero que sofra desse estado.

Preferem-se compostos de fórmula I ou sais farmacologicamente aceitáveis destes, em que:

M é Met, Ahx, Leu, Ala ou Ile, de preferência Met, Ahx, Ala ou Ile;

G é Gli ou DAla, de preferência Gli;

W é Trp;

X é Met, Ahx, Leu ou Ile, de preferência Met ou Ahx;

J é Asp;

F¹ é (S)-NH ou (S)-R²N;

F² é H, NO₂, R³ ou OR⁴, de preferência H ou OR⁴;

Z é NH₂.

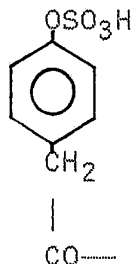
Um subgrupo de compostos que são preferidos são aqueles em que R¹, R², ou R⁴ representam metilo.



(R) e (S) referem-se às configurações absolutas em redor do átomo de carbono do metino adjacente.

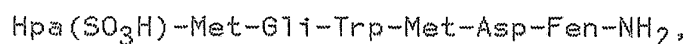
Todos os aminoácidos opticamente activos são da configuração L, a não ser que seja indicado de outro modo.

Hpa(SO₃H) é a fórmula



Os sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos I incluem sais de adição de bases. Estes incluem os derivados tanto de bases orgânicas como inorgânicas, por exemplo, amónia, hidróxido de sódio, hidróxido de bário, hidróxido de tetraetilamónio, etilamina, dietilamina, trietilamina e similares.

Para fins de brevidade, os péptidos de fórmula I podem ser representados por, por exemplo:



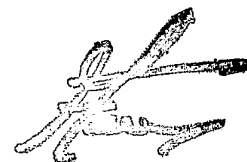
que se refere ao composto de fórmula I em que M é Met, G é Gli, W é Trp, X é Met, J é Asp, F¹ é (S)-NH, F² é H e Z é NH₂.

Quando, nesta especificação e nas reivindicações apenas os aminoácidos, péptidos, grupos protectores, grupos activos, etc., forem representados por símbolos, utilizam-se os símbolos usuais tal como definidos pela IUPAC e IUB ou tal como são usados na arte. Dão-se abaixo exemplos de símbolos.

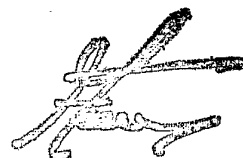
Abu	ácido 2-aminobutírico
Ahx	ácido 2-amino-hexanóico
Aib	ácido 2-aminoisobutírico
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico



BAsp	ácido β -aspártico
Boc	t-butiloxicarbonil
BrCH ₂ -Fam	4-(bromometil)fenilacetamidometil
Cis(Me)	S-metilcisteína
DAIa	D-alanina
DAhx	ácido D,2-amino-hexanóico
DAsp	ácido D-aspártico
DMet	D-metionina
DFen	D-fenilalanina
DFen-NH ₂	D-fenilalanina-amida
DTrp	D-triptofano
DTir	D-tirosina
EtFen	N-etilfenilalanina
EtFen-NH ₂	N-etilfenilalanina-amida
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gli	glicina
His	histidina
Hfa	ácido 4-hidroxifenilacético
Hfa(SO ₃ H)	O-sulfo-4-oxifenilacetil
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lis	lisina
MeAhx	ácido N-metil-2-amino-hexanóico
MeAsp	ácido N-metilaspártico
MeLeu	N-metil-leucina
MeIle	N-metilisoleucina
MeMet	N-metilmetionina
MeFen	N-metilfenilalanina
MeFen-NH ₂	N-metilfenilalanina-amida
Met	metionina
MetO	metionina-sulfoxido
MeTrp	N- α -metiltriptofano
MeTir	N-metiltirosina
MeTir(Me)	N,O-dimetiltirosina
MeTir(Me)-NH ₂	N,O-dimetiltirosina-amida



Mox	metoxinina
NaI	3-(2-naftil)alanina
OBt	1-benzotriazolil-éster
OCH ₂ -Fam	4-oximetilfenilacetamidometil
OSu	succinimidiloxi-éster
OtBu	t-butiléster
Fen	fenilalanina
Fen-NH ₂	fenilalanina-amida
Fen-NHEt	fenilalanina-etilamida
Fen-NHMe	fenilalanina-metilamida
Fen-N(Et) ₂	fenilalanina-dietilamida
Fen-N(Me) ₂	fenilalanina-dimetilamida
Fen-OH	ácido fenilalanínico
Fen(4-Cl)	3-(4-clorofenil)alanina
Fen(4-Cl)-NH ₂	3-(4-clorofenil)alanina-amida
Fen(4-Me)	3-(4-metilfenil)alanina
Fen(4-Me)-NH ₂	3-(4-metilfenil)alanina-amida
Fen(4-NO ₂)	3-(4-nitrofenil)alanina
Fen(4-NO ₂)-NH ₂	3-(4-nitrofenil)alanina-amida
Fen(4-NH ₂)	3-(4-aminofenil)alanina
Fen(4-NH ₂)-NH ₂	3-(4-aminofenil)alanina-amida
Pro	prolina
resina	poliestireno
Sar	sarcosina
Ser	serina
tBu	t-butil
Tre	treonina
Trp	triptofano
Trp(5-F)	5-fluorotriptofano
Trp(6-F)	6-fluorotriptofano
Trp(Me)	1-metiltriptofano
Tir	tirosina
Tir-NH ₂	tirosina-amida
Tir(Me)	O-metiltirosina
Tir(Me)-NH ₂	O-metiltirosina-amida
Tir(SO ₃ H)	O-sulfotirosina
Val	valina

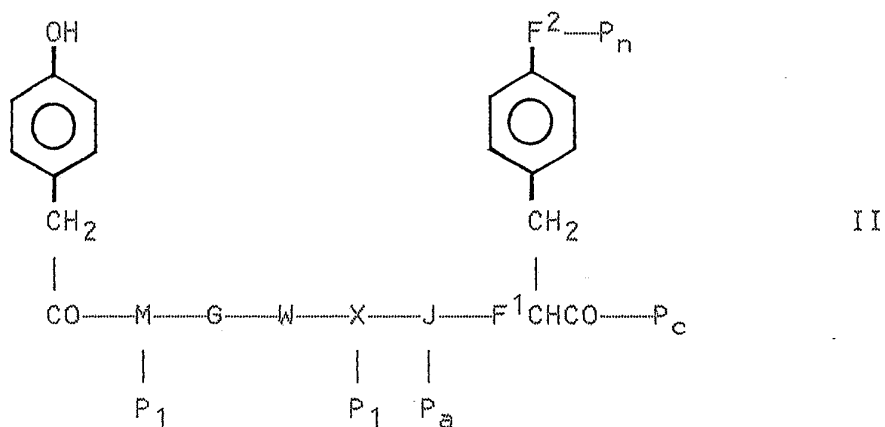


Preparação de péptidos

Os novos péptidos com ésteres sulfato deste invento e os novos intermediários para esses podem ser preparados por processos bem conhecidos na arte.

De acordo com o invento, proporciona-se um processo para a preparação de compostos de fórmula I ou de um sal farmacêuticamente aceitável destes, que compreende.

a) sulfatar um composto de fórmula II:



na qual

M, G, W, X, J, F¹, F² e Z são como definidos acima,

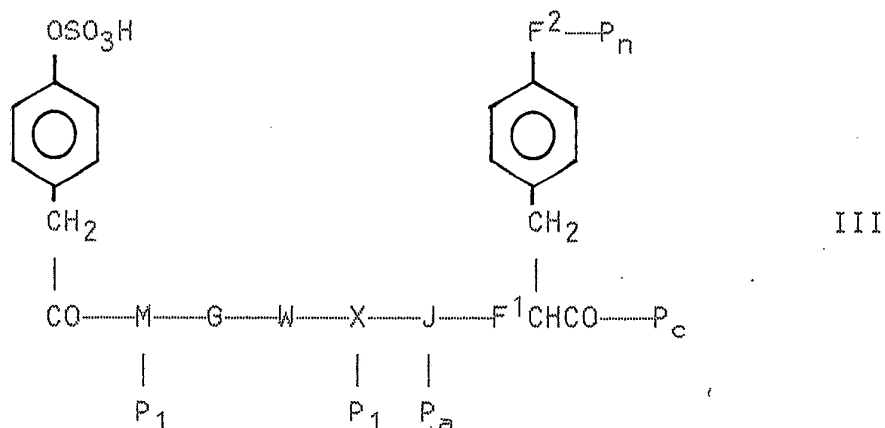
P₁ representa um grupo protector de amino sempre que M ou X representarem Lis,

P_a representa um grupo protector de carboxilo sempre que J representar Asp, D-Asp ou Me-Asp,

P_n representa um grupo protector de hidroxilo ou um grupo protector de amino sempre que F² representar NH₂ ou OH, e

P_c representa Z ou um grupo protector de carboxilo,

b) remover um ou mais grupos protectores de um composto correspondente de fórmula III

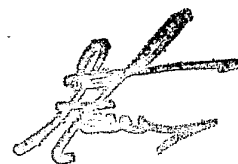


na qual M, G, W, X, J, F¹, F², P₁, P_a, P_n e P_c são como definidos acima, desde que pelo menos um dos P₁, P_a, P_n e P_c represente um grupo protector, e quando se deseje ou seja necessário, converter o composto resultante de fórmula I num sal farmacologicamente aceitável deste ou vice versa.

No processo a) o agente sulfatante pode ser por exemplo, trióxido de enxofre ou um complexo deste, como, por exemplo, trióxido de enxofre de piridina. Prefere-se particularmente efectuar a sulfatação num solvente polar aprótico, por exemplo dimetilformamida ou piridina. A reacção é preferencialmente executada utilizando um excesso de agente sulfatante, por exemplo um excesso molar de 10 - 40 vezes.

Nos processos a) e b) os grupos protectores para os péptidos e os processos para a sua remoção são bem conhecidos na arte, por exemplo, T W Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience (1981). A escolha de grupos protectores e dos processos utilizados para a sua remoção dependerão, inter alia, do processo de síntese utilizado para a preparação do péptido de fórmula III e dos aminácidos do péptido.

Os grupos protectores de amino adequados incluem, por exemplo, benziloxicarbonilo, que pode ser rapidamente removido por hidrogenólise ou brometo de hidrogénio em ácido acético;



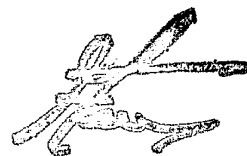
t-butiloxicarbonilo (Boc) que se remove pondo o péptido em ácido trifluoroacético frio; Fmoc, que pode ser removido por tratamento com piperidina diluída (20% em DMF); (4-metoxibenzil)oxicarbonilo e 2-nitrofenilsulfenilo. Os grupos Boc e Fmoc são particularmente preferidos.

Os grupos protectores de carboxilo que o P_c pode representar incluem, por exemplo, metilo, t-butilo, benzilo e 4-metoxibenzilo. Prefere-se particularmente o benzilo, que pode ser rapidamente removido por tratamento com amina ou amónia alcoólicas. Podem utilizar-se grupos similares para proteger o grupo fenol da tirosina, o grupo amino da lisina, os grupos hidroxilo ou amino das fenilalaninas substituídas e o grupo carboxilo do aspartato.

Quando o péptido for preparado utilizando técnicas de fase sólida, eg aquelas em que o terminal carboxilo do péptido está ligado a uma resina de fase sólida, a ligação do péptido à resina actua como um grupo protector do carboxilo.

A cisão da ligação peptidilo-resina desprotegerá o terminus carboxilo dos compostos de fórmula II. Uma vez que os produtos finais péptidos que contêm ésteres sulfato deste invento são amidas do terminal carboxilo, a ligação química que liga a cadeia peptídica à resina deve ser tal que a sua cisão com reagentes adequados proporcione rapidamente amidas. Devido à labilidade do grupo éster sulfato a ácidos fortes (por exemplo, fluoreto de hidrogénio líquido), a ligação peptidilo-resina deve ser cindível quer com ácidos mais fracos (por exemplo, tratamento breve com ácido trifluoroacético, TFA) e/ou nucleófilos (por exemplo, amónia, aminas, hidróxido e alcóxidos).

Dentre os derivados com resina adequados podem mencionar-se oximetil-poliestireno, 4-(oximetilfenil)-(CH₂)_n-aminometil-poliestireno (n = 0-3) e 4-(oximetilfenil)-oximetil-poliestireno. As resinas de poliacrilamida substituídas de modo semelhante são igualmente adequadas, como as resinas à base de poliestireno supra. O termo "poliestireno" inclui copolímeros com quantidades pequenas, geralmente 1%, de monómeros insaturados como o



divinilbenzeno.

O 4-(oximetilfenil)CH₂CO-aminometil-poliestireno [aqui referido por 4-(oximetilfenil)acetamidometilpoliestireno ou OCH₂-Pam-resina] é particularmente preferido para a produção de amidas de péptidos. Essa ligação deve ser rapidamente cindida para dar os péptidos de fórmula I, por reacção com soluções metanólicas de amónia, alquilaminas ou dialquilaminas, conforme seja necessário.

Os péptidos de fórmula III podem ser preparados por sulfatação de um péptido protegido correspondente da fórmula II.

Os péptidos não-protégidos de fórmula II podem ser produzidos por desprotecção de um péptido correspondente de fórmula II.

Os novos péptidos protegidos da fórmula II e os novos intermediários destes podem ser preparados por processos bem conhecidos na arte, podendo ser preparados, por exemplo, combinando aminoácidos individuais numa resina de fase sólida numa base passo-a-passo, ou, em alternativa, combinando grupos de aminoácidos numa resina de fase sólida para se obter o intermediário peptidilo-resina desejado. Essas adições, como é sabido, conseguem-se protegendo o grupo amino do aminoácido ou grupo de aminoácidos, convertendo-o, por exemplo, no seu derivado t-butiloxicarbonilo (Boc) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), e, depois, activando o grupo carboxílico desse aminoácido ou grupo de aminoácidos, convertendo-o, por exemplo, no seu derivado éster 1-hidroxibenzotriazolo (HOBt) ou N-hidroxissuccinimida (HOSu). A seguir, deixa-se esse intermediário protegido-activado reagir com um aminoácido-resina ou peptidilo-resina com um grupo amino livre, ampliando assim a cadeia peptídica para se obter o peptidilo-resina de fórmula II.

O aminoácido do terminal C da fórmula II pode ser ligado ao OCH₂-pam-resina de diversas maneiras. a) Por exemplo, pode reagir-se N-metilfenilalanina Boc-protégida com um éster 4-(bromometil)fenilacetato adequado (por exemplo, éster



fenacílico), processando-se depois para se obter ácido Boc-MeFen(4-oximetilfenil)acético, o qual pode ser acoplado a aminometil-poliestireno para se obter Boc-MeFen-(4-oximetilfenil)acetamidometilpoliestireno (Boc-MeFen-OCH₂-Pam-resina). b) Em alternativa, pode acoplar-se ácido 4-(bromometil)fenilacético a aminometilpoliestireno para se obter 4-(bromometil)fenilacetamidometilpoliestireno (BrCH₂-Pam-resina), o qual pode reagir-se com o sal de césio de Boc-MeFen-OH para se obter Boc-Fen-OCH₂-Pam-resina.

De entre os grupos activadores adequados pode ser mencionada qualquer combinação de grupos que torne a função ácido do aminoácido mais reactiva, tal como cloretos ácidos, anidridos mistos e sintéticos, produto da reacção com carbodíimida (por exemplo, díciclo-hexilcarbodíimida: DCC) e ésteres activos (por exemplo, ésteres derivados de HOBt, HOSu, 2- ou 4-nitrofenol e 2,4,5-triclorofenol). É particularmente preferida a utilização de DCC e de ésteres de HOBt e HOSu, do ponto de vista do rendimento, da ausência de produtos laterais e da consequente facilidade de purificação.

Pode utilizar-se um sintetizador automático de péptidos para a síntese em fase sólida das amidas de péptidos sulfatados deste invento. Os péptidos que contêm ésteres sulfato, de fórmula I, podem dessalificar e purificar-se pelos processos usuais. Por exemplo, o produto pode ser purificado por cromatografia de permuta iónica, utilizando Trisacril M DEAE, DEAE-celulose e similares, por cromatografia de partição, utilizando Sephadex LH-20, Sephadex G-25 ou similares, por cromatografia de fase inversa, utilizando Amberlite XAD-2, ODS-sílica-gel ou similares, por cromatografia de fase normal, utilizando sílica-gel ou similares, ou cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC).

O protocolo de acoplamento numa aminometil-resina ou peptidilo-OCH₂-Pam-resina (1 mmol de azoto disponível), desprotecção, sulfatação, cisão e purificação do produto é delineado na Tabela 1.



Tabela 1

Protocolo para síntese de fase sólida de amidas de péptidos sulfatados

<u>Passo</u>	<u>Reagente ou Solvente</u>	<u>Finalidade</u>	<u>Tempo de mistura</u>
1	DCM	Lavagem	1 min
2	Passar para o passo 3, 5 ou 8
3	Adicionar uma mistura filtrada, pré-activada (0°C, 1 h) de aminoácido protegido (ou dipéptido protegido, 3 mmol), HOBT (4,5 mmol) e DCC (3 mmol) em DMF/DCC 1:4.	Acoplamento de DCC/ /HOBT pré-activado.	2-15 h
4	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26
5	Adicionar aminoácido protegido (ou dipéptido protegido, 3 mmol) e HOBT (4,5 mmol) em 30 ml de DMF/DCM 1:2 e, a seguir DCC (3 mmol) em 20 ml de DCM.	Acoplamento de DCC/HOBT activado, <u>in situ</u>	2-15 h
6	2-propanol	Lavagem	1 min.
7	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26.
8	Adicionar éster ou anidrido activos (3 mmol) em DCM, DMF ou numa mistura destes.	Acoplamento activado sem DCC/HOBT.	2-15 h



Tabela 1 (cont.)

9	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26.
10	DCM	Lavagem	1 min.
11	Tratar com TFA/anisolo/ /DCM 49:1:50	Remoção de Boc e tBu.	30 min.
12	DCM	Lavagem	1 min.
13	Tratar com DIEA/DCM 1:19.	Neutralização	1 min.
14	DCM	Lavagem	1 min.
15	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26.
16	DMF	Lavagem	1 min.
17	Tratar com piperidina/ /DMF 1:4.	Remoção de Fmoc	3 min
18	Tratar com piperidina/ /DMF 1:4.	Remoção de Fmoc	7 min.
19	DMF	Lavagem	1 min.
20	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26.
21	DMF	Lavagem	1 min.
22	Piridina/DMF 1:2.	Lavagem	1 min.
23	Adicionar complexo de trióxido de enxofre de piridina (40 mmol) em 60 ml de piridina/DMF 1:2.	Sulfatação	20-24 h
24	DMF	Lavagem	1 min.
25	Passar para o passo 10, 16, 21 ou 26.
26	Metanol	Lavagem	1 min.

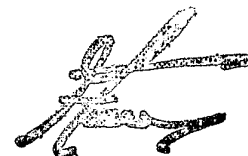


Tabela 1 (cont.)

-15-

27	Metanol saturado com amónia (-20°C) ou amina metanólica a 20% (250 ml).	Cisção da resina	2-5 dias
28	Metanol	Lavagem	1 min.
29	Combinar e concentrar os filtrados dos passos 27-28.	Isolamento
30	Cromatografar o resíduo em coluna(s) de Amberlite XAD-2 (Rohm and Haas, 2,5 x 60 cm, gradiente de metanol 0,1M em amónia), Trisacril M DEAE (LKB Inc., 2,5 x 47 cm, gradiente de bicarbonato de amónio) e/ou P-40 ODS-3 (Whatman, 4,8 x 50 cm, gradiente de metanol 0,2% em acetato de amónio).	Purificação

Processos análogos, nos quais as reacções são efectuadas sem o componente fase sólida (resina) são bem conhecidos na arte e são apropriados para produção em grande escala. [Ver, por exemplo, a Patente US 3 892 726].

Actividade Biológica

Os péptidos deste invento têm a capacidade de inibir a actividade de alimentação em mamíferos. Como resultado, têm utilidade na prevenção e no tratamento da obesidade.

A actividade de inibição da alimentação pode ser demonstrada em ratazanas como se segue:

Mantêm-se ratazanas Sprague-Dawley macho (pesando 300-350 g) engaiolados individualmente sob um ciclo de luz/escuridão de 12 horas e treinam-se durante pelo menos 14 dias para se alimentarem durante um período de três horas do ciclo de escuridão mas não



durante as 21 horas que precedem esse período de três horas. No dia do estudo, doseiam-se as ratazanas intraperitonealmente com solução salina (controlos) ou com composto de teste (dissolvido em solução salina; em geral, numa concentração de 0,3 a 300 g de composto de teste por kg de pesos de ratazana). Introduce-se comida 10 minutos depois da administração da solução salina ou do composto de teste. Conclui-se que os compostos de teste são activos se o grupo de teste consumir significativamente menos comida do que os controlos com solução salina, durante o período de alimentação, que termina quer 0,5 quer três horas depois da apresentação da comida.

Os péptidos do invento têm a capacidade de estimular a contracção da vesícula biliar em mamíferos. Portanto, também são úteis como auxiliares de diagnóstico no exame da vesícula biliar por raios-X. A utilização de agentes contractores da vesícula biliar como auxiliares de diagnóstico é um procedimento médico bem estabelecido.

Os péptidos do invento têm a capacidade de se ligarem aos receptores de colecistoquinina (CCK). Os receptores CCK distintos dos tecidos cerebrais e periféricos foram classificados como receptores CCK-A e CCK-B, respectivamente. A diferenciação entre interacções agonistas e antagonistas nos receptores CCK também pode ser determinada por ensaios funcionais. A activação de receptores de CCK-A em tecidos periféricos desempenha um papel importante no controlo da secreção pancreática, motilidade dos intestinos e contracção da vesícula biliar. Portanto, os compostos com actividade agonista em receptores de CCK-A têm utilidade no tratamento de obesidade e desarranjos de motilidade e os compostos com actividade antagonista em receptores de CCK-A podem ter utilidade em desarranjos gastrintestinais, tais como o síndrome do intestino irritável, úlceras, secreção pancreática ou gástrica em excesso, pancreatite aguda e desarranjos de motilidade.



Ensaio in vitro

Ligação de CCK-A

A avaliação dos compostos de teste quanto à sua capacidade de se ligarem a receptores de CCK-A em membranas pancreáticas de ratazana foi feita em relação à ligação de ^{125}I -CCK-8 e ^3H -L364718 de Bolton-Hunter a pâncreas de ratazana, de acordo com o processo de Chang, Lotti, Chan e Kunkel (Molecular Pharmacology, 30:212-216, 1986).

Ligação de CCK-B

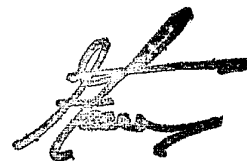
A avaliação dos compostos de teste quanto à sua capacidade de se ligarem a receptores de CCK-8-B em membranas de córtex cerebral de ratazanas foi feita em relação a ^{125}I -CCK-8, de acordo com o processo de Chang e Lotti (Soc. Natl. Acad. Sci. Vol. 83, 4923-4926).

Ensaio funcional da actividade agonista/antagonista em relação a CCK-A.

A avaliação dos compostos de teste quanto à sua capacidade para inibirem ou estimularem a libertação de amilase por fragmentos de tecido pancreático de ratazana (células acinares) foi feita de acordo com os processos de Lin et al. (J of Pharm. and Exper. Therapeutics, 1986, 729-734) e Jung (Clinica Chema Acta, 1980, 100, 7-11).

Os compostos de fórmula I e os seus sais farmacologicamente aceitáveis têm a vantagem de que, em determinados modelos farmacológicos, são mais eficazes, mais potentes, actuam durante mais tempo, são mais estáveis, particularmente em relação à degradação enzimática, são mais selectivos, menos tóxicos, dão origem e menos efeitos laterais, por exemplo ausência de emese, são absorvidos mais rapidamente, actuam mais rapidamente ou têm outros efeitos vantajosos quando comparados com compostos de estrutura similar à dos compostos de fórmula I.

De acordo com o invento, também se proporciona a utilização dos compostos de fórmula I e de sais farmacologicamente aceitáveis



destes na produção de um medicamento para utilização no tratamento da obesidade.

De acordo com o invento, também se proporciona uma composição farmacêutica que compreende (de preferência menos de 80% e mais preferencialmente menos de 50%, em peso, de) um composto de fórmula I ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com um adjuvante, diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

Os péptidos de fórmula I ou um seu sal farmacêuticamente aceitável podem ser ministrados através de uma diversidade de vias, por exemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente ou intranasalmente. A dosagem do composto de fórmula I dependerá de vários factores, incluindo os requisitos do recipiente e do composto particular empregue, mas estará tipicamente na gama de 0,3 µg a 3,0 mg por kg de peso corporal, por dia, quer numa dose única quer dividida em duas a quatro doses.

O invento é ilustrado mas não é de modo nenhum limitado pelos exemplos seguintes.

Utilizou-se um sintetizador automático de péptidos para a síntese em fase sólida das amidas de péptidos sulfatados do invento. O protocolo de acoplamento em aminometil-resina ou peptidil-OCH₂-Pam-resina (1 mmol de azoto disponível), desprotecção, sulfatação, cisão e purificação do produto é delineado na Tabela 1.

As sínteses peptídicas, a não ser que se indique de outro modo, foram iniciadas com 1 miliequivalente de aminometil-resina, sendo a resina um copolímero de estireno:divinilbenzeno 99:1 em peso. As reacções foram efectuadas à temperatura ambiente a não ser que se indique de outro modo. Os passos de lavagem foram efectuados por três vezes com 50 ml do solvente especificado, a não ser que se indique de outro modo.

Exemplo 1

Ácido Boc-MeFen-(4-oximetilfenil)acético

A uma solução de Boc-MeFen-OH (27,93 g) e éster fenacílico



de ácido 4-(bromometil)fenilacético (33,32 g) em acetonitrilo (1 000 ml), adicionou-se fluoreto de potássio di-hidratado (18,28 g). Agitou-se a suspensão durante a noite, filtrou-se e evaporou-se o filtrado até à secura. Dissolveu-se o resíduo, éster fenacílico do ácido Boc-MeFen-(4-oximetilfenil)acético, em ácido acético a 85% (1 200 ml), tratou-se com zinco em pó (128 g) e agitou-se durante 2-4 horas. A concentração da mistura reaccional filtrada até cerca de 400 ml e a diluição com 3 200 ml de água produziu um óleo que se dissolveu em acetato de etilo e se tratou com diciclo-hexilamina (DCHA) para dar 41,31 g do sal de DCHA do composto do título, com pf de 120-122°C.

Os compostos seguintes foram preparados utilizando essencialmente o mesmo processo:

Ácido Boc-EtFen-(4-oximetilfenil)acético, com pf de 137-141°C (sal de DCHA);

Ácido Boc-Fen(4-Cl)-(4-oximetilfenil)acético;

Ácido Boc-Tir(Me)-(4-oximetilfenil)acético, com pf de 64-67°C (base livre);

Ácido Fmoc-Tir(tBu)-(4-oximetilfenil)acético, com pf de 192-195°C (base livre);

Exemplo 2

Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH

Preparou-se Fmoc-Met-OSu in situ por reacção de Fmoc-Met-OH (14,87 g), HOSu (5,52 g) e diciclo-hexilcarbodiimida (DCC; 8,26 g) em THF (200 ml), a 0°C, durante 3,5 horas. Removeu-se a diciclo-hexilureia (DCU) precipitada por filtração e adicionou-se o filtrado em THF a uma solução fria de H-Asp(OtBu)-OH em 220 ml de água/THF 10:1 à qual tinham sido adicionados 40 ml de hidróxido de sódio 1N. Depois de se agitar a mistura reaccional à temperatura ambiente durante a noite, adicionou-se ácido cítrico sólido (20 g) juntamente com acetato de etilo (600 ml). Separou-se a fase de acetato de etilo, lavou-se com ácido cítrico a 10% e salmoura e, depois, secou-se (sulfato de magnésio). A evaporação da solução de acetato de etilo produziu um resíduo que se dissolveu em acetato de etilo (200 ml) e se tratou com DCHA



(7,84 ml) para se precipitar 17,93 g do sal de DCHA do composto do título, com pf de 159-162°C.

Exemplo 3

H-Fen-OCH₂-Pam-resina

Dissolveram-se ácido Boc-Fen-(4-oximetilfenil)acético (0,83 g; 2 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt; 0,46 g; 3 mmol) e DCC (0,41 g; 2 mmol) em 50 ml de DCM/DMF 4:1 e agitou-se a 0°C durante 1 hora. Suspendeu-se aminometil-resina (1,34 g; 1 mmol de azoto disponível) na mistura reaccional filtrada (removeu-se o DCU precipitado) e agitou-se durante 2-15 horas. O produto, Boc-Fen-OCH₂-Pam-resina, foi isolado por filtração e foi tratado de acordo com a Tabela 1 (passos 10-14), para dar o composto do título.

Prepararam-se os H-Fen(4-Cl)-OCH₂-Pam-resina e H-Tir(Me)-OCH₂-Pam-resina, utilizando processos essencialmente similares.

Exemplo 4

H-MeFen-OCH₂-Pam-resina

Adicionou-se ácido Boc-Me-Fen-(4-oximetilfenil)acético (de 1,82 g; 3 mmol do seu sal de DCHA) e HOBt (6,9 g; 4,5 mmol) em 40 ml de DMF/DCM 1:3, seguido por DCC (0,62 g; 3 mmol) em 20 ml de DCM, a aminometil-resina (1,34 g; 1 mmol de azoto disponível), para se obter uma suspensão que foi agitada durante 2 a 15 horas. O Boc-MeFen-OCH₂-Pam-resina foi isolado por filtração, foi lavado com 2-propanol e DCM e foi tratado de acordo com a Tabela 1 (passos 10-14), para dar o composto do título na forma de base livre.

Preparou-se o H-EtFen-OCH₂-Pam-resina, utilizando essencialmente o mesmo processo.

Exemplo 5

H-Fen(4-NO₂)-OCH₂-Pam-resina

Dissolveu-se Boc-Fen(4-NO₂)-OH (1,39 g) em metanol a 70% (100 ml) e ajustou-se a pH 7 por adição de bicarbonato de céσιο 1N. Evaporou-se a solução até à secura, sendo o resíduo evaporado mais três vezes com DMF adicionado. O sal de céσιο de



Boc-Fen(NO₂)-OH, seco, resultante foi dissolvido em DMF (60 ml) e foi agitado com BrCH₂-Pam-resina (1 meq de Br) durante a noite. Isolou-se o Boc-Fen(4-NO₂)-OCH₂-Pam-resina por filtração, lavou-se com DCM e tratou-se de acordo com a Tabela 1 (passos 10-14), para dar o composto do título na forma de uma base livre.

Exemplo 6

H-Tir(tBu)-OCH₂-Pam-resina

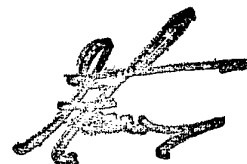
Dissolveram-se ácido Fmoc-Tir(tBu)-(4-oximetilfenil)acético (1,82 g; 3 mmol), 1-hidroxibenzotriazolo (0,69 g; 4,5 mmol) e DCC (0,62 g; 3 mmol) em 50 ml de DCM/DMF 4:1 e agitou-se a 0°C durante 1 hora. Suspendeu-se aminometil-resina (1,34 g; 1 mmol de azoto disponível) na mistura de reacção filtrada (removeu-se a DCU precipitada) e agitou-se durante 2-15 horas. Isolou-se o Fmoc-Tir(tBu)-OCH₂-Pam-resina por filtração e tratou-se de acordo com a Tabela 1 (passos 16-20), para dar o composto do título na forma de uma base livre.

Preparou-se H-MeTir(Me)-OCH₂-Pam-resina, utilizando essencialmente o mesmo processo.

Exemplo 7

Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-Asp-Fen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-Fen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-Fen-OCH₂-resina, que se acoplou com éster N-hidroxissuccinimidico do ácido 4-hidroxifenilacético (Hpa-OSu), de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29 com amónia), para se obter o composto do título o qual se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2, Trisacril M DEAE e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para se obter 100 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Asp 1,03 (1), Met 1,98 (2), Gli 1,02 (1) e Fen 0,98 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a



1050 cm^{-1} .

Exemplo 8

Hpa(SO₃H)-Ala-Gli-Trp-Met-Asp-Fen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-Fen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-PH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ala-OH de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ala-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-Fen-OCH₂-Pam-resina que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos 8-9), para dar Hpa-Ala-Gli-Trp-Met-Asp-(OtBu)-Fen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia), para se obter o composto do título, o qual se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para se obter 150 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Asp 1,18 (1), Met 0,85 (1), Ala 0,94 (1), Gli 1,09 (1) e Fen 0,92 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 9

Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Met-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia), para dar o composto do título, o qual se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 130 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,95 (2), Asp



1,00 (1), Gli 0,97 (1) e MeFen 1,08 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 10

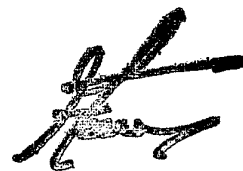
Hpa(SO₃H)-Ala-Gli-Trp-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ala-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ala-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Ala-Gli-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou a cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia), para dar o composto do título, o qual se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 180 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Ala 0,97 (1), Met 0,82 (1), Gli 1,00 (1), Asp 1,10 (1) e MeFen 1,11 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 11

Hpa(SO₃H)-Met-DAla-Trp-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-DAla-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-DAla-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que foi acoplado com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Met-DAla-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual foi desprotegido, sulfatado e cindido da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 40



mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Asp 1,10 (1), Met 1,79 (2), Ala 0,98 (1) e MeFen 1,13 (1).

O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster do ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 12

Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Ala-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-Gli-Ala-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9) para dar Hpa-Met-Gli-Ala-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amónia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 30 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,76 (2), Asp 1,12 (1), Gli 1,07 (1) Ala 1,03 (1) e MeFen 1,02 (1).

O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster do ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 13

Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Ala-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Ala-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-Gli-Trp-Ala-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Met-Gli-Trp-Ala-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amónia), para dar o composto do título, que se purificou

cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 140 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Ala 0,97 (1), Met 0,83 (1), Gli 0,97 (1), Asp 1,09 (1) e MeFen 1,15 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 14

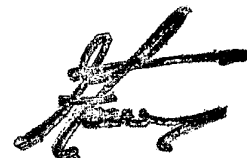
Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-Ala-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Ala-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Met-Gli-Trp-Met-Ala-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9) para dar Hpa-Met-Gli-Trp-Met-Ala-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois passos 26-29, com amônia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 170 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,73 (2), Gli 0,98 (1), Ala 0,98 (1) e MeFen 1,31 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 15

Hpa(SO₃H)-Ala-Gli-Trp-Ala-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Ala-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ala-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ala-Gli-Trp-Ala-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Ala-Gli-Trp-Ala-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia),



para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar o sal de amónio do composto do título.

Exemplo 16

Hpa(SO₃H)-Ahx-Gli-Trp-Ahx-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Ahx-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ahx-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ahx-Gli-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9) para dar Hpa-Ahx-Gli-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amónia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 80 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Ahx 1,93 (2), Asp 1,00 (1), Gli 0,97 (1) e MeFen 1,10 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm⁻¹.

Exemplo 17

Hpa(SO₃H)-Ile-Gli-Trp-Ile-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Ile-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ile-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ile-Gli-Trp-Ile-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9) para dar Hpa-Ile-Gli-Trp-Ile-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amónia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3,



sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passos 30), para dar 50 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Ile 1,88 (2), Asp 1,02 (1), Gli 0,98 (1) e MeFen 1,12 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 18

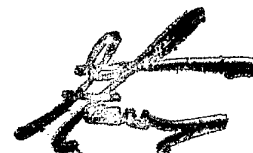
Hpa(SO₃H)-Ile-Gli-Trp-Ahx-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Ahx-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gli-OH e Fmoc-Ile-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc, 16-20), para se obter H-Ile-Gli-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Ile-Gli-Trp-Ahx-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amônia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passos 30), para dar 120 mg do sal de amônio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Ile 1,04 (1), Trp 0,82 (1), Asp 1,04 (1), Gli 1,03 (1), Ahx 1,03 (1) e MeFen 0,86 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 19

Hpa(SO₃H)-Met-Ala-Trp-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7, seguidos pelos passos da remoção de Fmoc 16-20), para se obter H-Met-Ala-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9), para dar Hpa-Met-Ala-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 20-25 e, depois, passos 26-29, com amônia),



para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30) para dar 60 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,89 (2), Asp 0,99 (1), Ala 0,99 (1) e MeFen 1,12 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

Exemplo 20

Hpa(SO₃H)-Met-βAla-Trp-Met-Asp-MeFen-NH₂

Acoplou-se sequencialmente H-MeFen-OCH₂-Pam-resina com Fmoc-Met-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp-OH; Fmoc-βAla-OH e Fmoc-Met-OH, de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 5-7 seguidos pelos passos da remoção de Fmoc 16-20), para dar H-Met-βAla-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, o qual se acoplou com Hpa-OSu de acordo com a Tabela 1 (passos de acoplamento 8-9) para dar Hpa-Met-βAla-Trp-Met-Asp(OtBu)-MeFen-OCH₂-Pam-resina, que se desprotegeu, sulfatou e cindiu da resina de acordo com a Tabela 1 (passos 10-15, passos 21-25 e, depois, passos 26-29, com amónia), para dar o composto do título, que se purificou cromatograficamente em Amberlite XAD-2 e P-40 ODS-3, sequencialmente, de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 41 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,94 (2), Asp 1,02 (1), βAla 0,84 (1) e MeFen 1,01 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} .

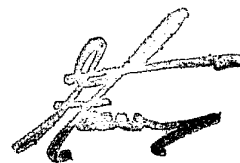
Exemplo 21

Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-DAsp-MeFen-NH₂

Como resultado da racemização durante a síntese do Exemplo 9, isolou-se Hpa(SO₃H)-Met-Gli-Trp-Met-DAsp-MeFen-NH₂ como produto lateral, durante a purificação do Exemplo 9 de acordo com a Tabela 1 (passo 30), para dar 47 mg do sal de amónio do composto do título. A análise de aminoácidos a seguir à decomposição ácida deu Met 1,80 (2), Gli 1,03 (1), Asp 1,06, e MeFen 1,11 (1). O espectro de absorção de infra-vermelhos

71 838
IR 3996A

-29-

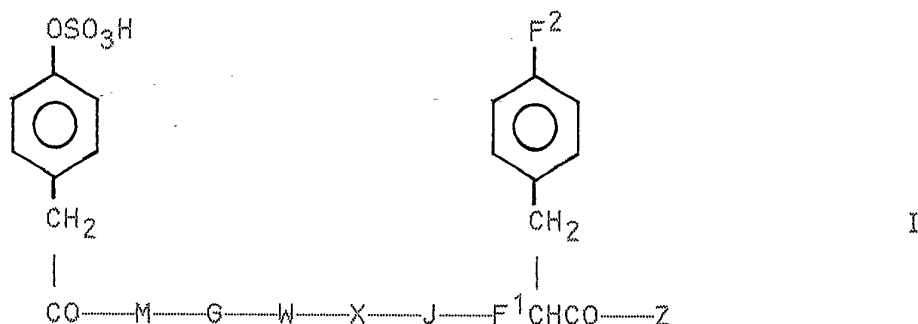


revelou um pico pronunciado, típico de um éster de ácido sulfúrico, a 1050 cm^{-1} . A presença de DAsp foi verificada pelo método de Marfey (P. Marfey, Carlsberg Res. Commun., 1984, 49, 591-596).



REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a preparação de compostos de fórmula I:



na qual:

M é Met, DMet, MeMet, MetO, Ahx, DAhx, MeAhx, Leu, MeLeu, Pro, Ile, MeIle, Ala ou Lys;

G é Gly, DAla, Pro, Ala, β Ala ou Sar;

W é Trp, MeTrp, Ala ou Nal;

X é Met, MeMet, MetO, Ahx, MeAhx, Leu, MeLeu, Pro, Ile, MeIle, Ala ou Lys;

J é Asp, DAsp, MeAsp, Ala ou Asn;

F¹ é (S)-NH, (R)-NH, (S)-R¹N ou (R)-R²N;

F² é H, Cl, I, Br, F, NO₂, NH₂, R³ ou OR⁴;

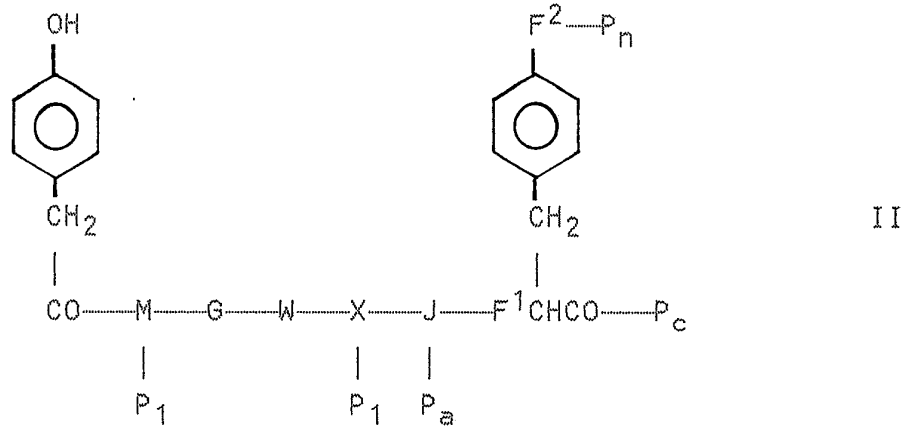
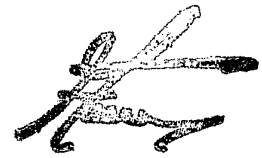
Z é NH₂, NHR⁵ ou NR⁵R⁶;

R¹, R², R³, R⁵ e R⁶ são alquilo C1 a 6; e

R⁴ é H ou alquilo C1 a 6,

e de seus sais farmacologicamente aceitáveis, caracterizado por compreender:

a) sulfatar um composto de fórmula II:



na qual,

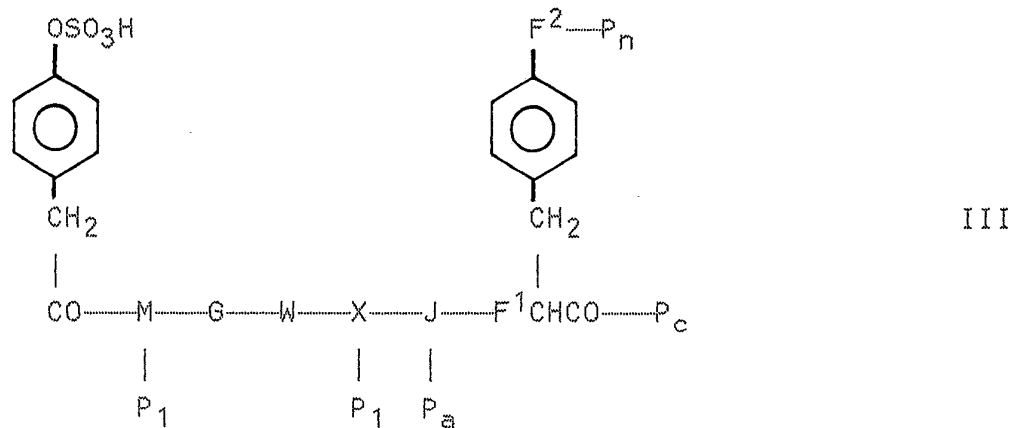
M, G, W, X, J, F¹, F² e Z são definidos como acima,

P₁ representa um grupo protector de amino quando M ou X representam Lys,

P_a representa um grupo protector de carboxilo quando J representa Asp, D-Asp ou Me-Asp,

P_n representa um grupo protector de hidroxilo ou um grupo protector de amino quando F² representa NH₂ ou OH, e P_c representa Z ou um grupo protector de carboxilo,

b) remover um ou mais grupos protectores de um composto correspondente de fórmula III



na qual M, G, W, X, J, F¹, F², P₁, P_a, P_n e P_c são definidos como acima,



desde que pelo menos um de P_1 , P_a , P_n e P_c represente um grupo protector e, quando for desejado ou necessário, converter o composto de fórmula I resultante num seu sal farmacologicamente aceitável ou vice versa.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por M ser Met, Ahx, Leu, Ala ou Ile.

3 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por X ser Met, Ahx, Leu ou Ile.

4 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por F^1 ser (S)-NH ou (S)- R^2N .

5 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por Z ser NH_2 .

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto de fórmula I ser:

Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;
ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto de fórmula I ser:

Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ala-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ala-Gly-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-DAla-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Ala-Met-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Ala-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Ala-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ala-Gly-Trp-Ala-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ahx-Gly-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ile-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Ile-Gly-Trp-Ahx-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-Ala-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-βAla-Trp-Met-Asp-MePhe-NH₂;
Hpa(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-DAsp-MePhe-NH₂;
ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

8 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender associar um composto de fórmula I

71 838

IR 3996A

-33-

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, definidos como na reivindicações 1, com transportadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa, 26. NOV. 1990

Por FISOONS CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized name, possibly "F. S. S.", written over a horizontal line.