

(11) *Número de Publicação:* PT 90902 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K007/02 A

C07K001/00 B

A61K037/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.06.19

(30) *Prioridade:* 1988.06.20 US 208926

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.12.29

(45) *Data e BPI da concessão:*
06/94 1994.06.03

(73) *Titular(es):*

MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC.
2110 EAST GALBRAITH ROAD CINCINNATI, OHIO
45215 US

(72) *Inventor(es):*

SCOTT LEE HARBESON US
STEPHEN HENDERSEN BUCK US
JAMES RAY MCCARTHY US
JOHN LEONARD KRSTENANSKY US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS PEPTÍDICOS COM ACTIVIDADE
ANTAGONISTA DA NEUROQUININA A

(57) *Resumo:*

[Fig.]

E.S. 90.102

4.

MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS
PEPTÍDICOS COM ACTIVIDADE ANTAGONISTA
DA NEUROQUININA A".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a novos derivados peptídicos que são antagonistas da neuroquinina A.

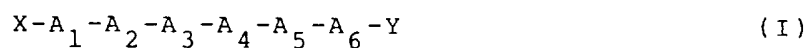
Antecedentes da Invenção

A substância P e taquiquininas relacionadas, neuroquinina A e neuroquinina B são um grupo de péptidos de ocorrência natural exibindo uma larga distribuição nos tecidos corporais e uma grande variedade de efeitos biológicos. Enquanto que os agonistas e antagonistas da substância P e de neuroquinina B são conhecidos e enquanto os agonistas de neuroquinina A são conhecidos igualmente, os antagonistas de neuroquinina A não foram até ao presente assinalados. Os requerentes descobriram presentemente uma classe de antagonistas da neuroquinina A. Estes compostos não são somente interessantes sob o ponto de vista bioquímico mas também possuem utilidade médica e farmacológica valiosa.

4.

Resumo da Invenção

Derivados peptídicos antagonistas da neuro-quinina A com a seguinte fórmula geral de estrutura



na qual

X representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo com 1 a 6 átomos de carbono ou um grupo acilo com 2 a 10 átomos de carbono;

A₁ representa uma ligação ou um grupo contendo de 1 a 4 aminoácidos;

A₂ representa uma ligação, Asp ou Glu;

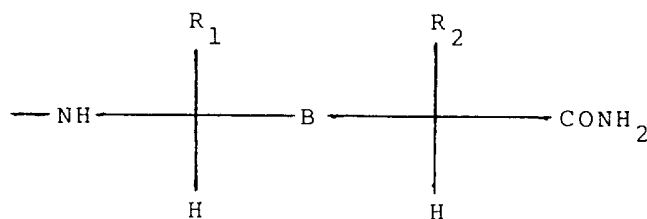
A₃ representa aminoácido qualquer;

A₄ representa Phe ou N-Me-Phe;

A₅ representa Ile, Val, Leu, Phe, Ala, Tyr, Nle, Met, N-Me-Val;

A₆ representa Gly ou Sar; e

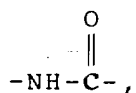
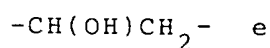
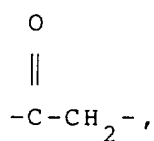
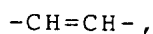
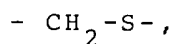
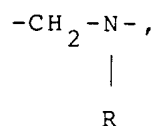
Y representa um grupo de fórmula geral



na qual

B representa um grupo de fórmula geral

4.



em que

R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono ou fenilalquileno em que o grupo alquileno de cadeia linear ou ramificada comporta de 1 a 6 átomos de carbono e o grupo fenilo comporta facultativamente um substituinte escolhido entre um átomo de halogéneo ou um grupo alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} ou hidroxí;

R_1 e R_2 representam cada um, independentemente, um grupo isopropilo, isobutilo, sec-butilo, n-butilo ou 2-(metil-tio)etilo;

e os seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Estes novos derivados peptídicos são antagonistas da neuro-quinina A e portanto utilizáveis como agentes antiasmáticos, anti-inflamatórios e anti-artríticos.

Descrição detalhada da presente invenção

As abreviaturas correntes comuns dos amino-ácidos e grupos amino e carboxi terminais são utilizadas ao longo da presente memória descritiva.

Gly (ou G) - glicina
Ala (ou A) - alanina
Val (ou V) - valina
Leu (ou L) - leucina
Ile (ou I) - isoleucina
Fum - fumarilo
Orn - ornitina
Pro (ou P) - prolina
Phe (ou F) - fenilalanina
Trp (ou W) - triptofano
Met (ou M) - metionina
Ser (ou S) - serina
Thr (ou T) - treonina
Cys (ou C) - cisteína
Tyr (ou Y) - tirosina
Asn (ou N) - asparagina
Gln (ou Q) - glutamina
Asp (ou D) - ácido aspártico
Glu (ou E) - ácido glutâmico
Lys (ou K) - lisina
Arg (ou R) - arginina

4.

His (ou H) - histidina

Nle - norleucina

Hyp - hidroxiprolina

Glt - glutaril

Mal - maleilo

Npa - β -(2-naftil)alanina

3,4-dehidroPro - 3,4-dehidroprolina

Pgl - fenilglicina

NMePgl - N-metil-fenilglicina

Sar - sarcosina (N-metilglicina)

pSubPhe - para fenilalanina substituída

SubPhe - orto, meta, ou para, mono- fenilalamina substituída

DAla (ou a) - D-alanina

Ac - acetil

Suc - succinil

pClPhe - para-cloro-fenilalanina

pNO₂Phe - para-nitro-fenilalanina

NMeVal - N-metil-valina

Considera-se que qualquer grupo alquilo ou fracção alquilica de um grupo alcoxi inclui grupos alquilo de cadeia linear, ramificada ou ciclica, por exemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, ciclo pentilo, hexilo, iso-hexilo, ciclo-hexilo, e ciclopentilmetil. O radical alqui-

leno dos grupos fenilalquileno da presente invenção poder conter de 1 a 4 átomos de carbono e ser de cadeia linear ou ramificada por exemplo metileno, etileno, propileno, butileno, isopropilideno e sec-butilideno. O radical fenilo dos grupos fenilalquileno desta invenção podem ser insubstituídos ou mono-substituídos nas posições orto, meta ou de preferência para. São preferidos os grupos fenilo ou para hidroxifenilo insubstituídos. Considera-se que um grupo acilo com 2 a 10 átomos de carbono inclui grupos acilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica eventualmente saturados com 1 ou 2 radicais carbonilo por grupo, por exemplo, acetilo, benzoilo, succinilo, maleilo e glutarilo. Um grupo de halogeneo é um átomo de fluoro, cloro, bromo ou iodo. Nos grupos representados por X da presente invenção o átomo de hidrogênio, o grupo alquilo ou acilo estão ligados ao grupo α -amino do aminoácido aminoterminal. Aqueles peptídeos em que o grupo amino do aminoácido aminoterminal tem como substituinte dois grupos alquilo ou acilo também são considerados como abrangidos pelo âmbito dos peptídeos da presente invenção.

Deverá ser evidente de que os derivados peptídicos da presente invenção abrangem os peptídeos em que a ligação amido peptídica normal dos dois aminoácidos de terminal carbono, da neuroquinina A de ocorrência natural foram modificados e estes dois aminoácidos modificados são quimicamente representados ali como o grupo Y. Utilizando-se a nomenclatura convencional adoptada pela química peptídica, o grupo representado por Y que é constituído por dois resi-

duos de leucina, isto é, em que R_1 e R_2 representam cada um um grupo sec-butilo, tendo a sua ligação amida modificada por redução do grupo carbonilo a grupo metileno podem ser designados por Leu $\Psi[CH_2NH]Leu$. Esta designação indica que o grupo carbonilo da amida da penultima leucina está reduzido para um grupo metileno. Outras designações de nomenclatura utilizadas para descrever os derivados péptidicos da presente invenção são $\Psi[CH_2S]$, $\Psi[CH_2O]$, $\Psi[CH=CH]$, $\Psi[C(O)CH_2]$, $\Psi[CH(OH)CH_2]$ e $\Psi[NHC(O)]$.

A designação "uma ligação", quando utilizada em relação à definição de A_1 entende-se significar que o grupo representado por X é ligado directamente a um grupo A_2 ou nas circunstâncias em que A_2 também representa uma ligação X está directamente ligado a um grupo A_3 .

Do mesmo modo a designação "uma ligação", quando utilizada em relação à definição de A_2 entende-se significar que A_1 está ligado directamente ao grupo A_3 ou nas circunstâncias em que o grupo A_1 também representa uma ligação então X está ligado directamente ao grupo representado por A_3 .

A designação "aminoácido qualquer" utiliza-se para incluir os aminoácidos de ocorrência natural assim como outros -aminoácidos "não proteínicos" correntemente utilizados pelos técnicos na química dos péptidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são: glicina, alamina, valina, leucina, isoleucina, serina, metionina,

4.

treonina, fenilalamina, tirosina, triptofano, cisteína, prolina, histidina, ácido aspartico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, arginina, ornitina e lisina. Exemplos de aminoácidos "não proteínicos" são a morleucina, norvalina, aloisoleucina, homoarginina, tiaprolina, desidroprolina, hidroxiprolina (Hip), homo-serina, ciclo-hexilglicina (Chg), ácido α -amino n-butírico (Aba), ciclo-hexilalamina (Cha), ácido aminofenilbutírico (Pba), fenilalaminas substituídas nas posições orto, meta ou para, do grupo fenilo tendo como um ou dois substituintes os átomos ou grupos seguintes:

alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , halogêneo, grupos nitro ou substituídos com um grupo metileno dioxi, β -2- e 3-tienilalanina, β -2- e 3-furanilalamina, β -2-, e 3- e 4-piridilalanina, β -(benzotianil-2- e 3-il)alamina, β -(1- e 2-naftil)alamina, derivados O-alquilados de serina, Treonina ou tirosina, S-alquilados de cisteína, O-sulfato éster de tirosina, 3-5-diiodotirosina e D-isômeros dos aminoácidos de ocorrência natural.

Os aminoácidos naturais, com exceção da glicina, contêm um átomo de carbono quiral. A menos que especificado de um outro modo, os aminoácidos opticamente activos referidos aqui apresentam a configuração L. Como habitualmente, a estrutura dos peptídeos representada aqui por extenso é tal que a extremidade aminoterminal apresenta-se do lado esquerdo da cadeia e a extremidade carboxi-terminal do lado direito. De acordo com o exposto e com o hábito corrente

os grupos B são desenhados de modo que a valência aberta do lado esquerdo está ligada ao átomo de carbono do grupo representado por Y que suporta um "H", o grupo " R_1 " e o grupo "NH" e a valência aberta do lado direito do grupo B está ligada ao átomo de carbono do grupo " R_2 " e um grupo " $CONH_2$ ".

Os polipéptidos de fórmula geral I podem formar sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico com qualquer ácido inorgânico ou orgânico não Tóxico. Ácidos inorgânicos representativos que constituem sais apropriados incluem o ácido clorídrico, o ácido bromídrico, o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico e sais de metal ácido tais como o monohidrogeno ortofosfato de sódio e o hidrogeno sulfato de potássio. Ácidos orgânicos representativos que formam sais apropriados incluem os ácidos mono, di e tricarboxílicos. Representativos destes ácidos são, por exemplo, o ácido acético, o ácido glicólico, o ácido láctico, o ácido pirúvico, o ácido malônico, o ácido succínico, o ácido glutárico, o ácido fumárico, o ácido málico, o ácido tartárico, o ácido cítrico, o ácido ascórbico, o ácido maleico, o ácido hidroximaleico, o ácido benzóico, o ácido hidroxibenzoico, o ácido fenilacético, o ácido cinâmico, o ácido salicílico, os ácidos 2-fenoxibenzoico e sulfônicos tais como o ácido metanossulfônico e 2-hidroxietanossulfônico. Os sais dos aminoácidos de terminal carboxilo incluem os sais dos ácidos carboxílicos não tóxicos formados com quaisquer bases orgânicas ou inorgânicas apropriadas. Estes sais incluem os sais de metais alcalinos,

como por exemplo, os sais de sódio e de potássio; os sais de metais alcalinoterrosos tais como os de magnésio e cálcio; os sais de metais leves do grupo IIIA que inclui o alumínio e os sais de aminas orgânicas primárias, secundárias ou terciárias como por exemplo de trialkilaminas que incluem a trietilamina, a procaína, a dibenzilamina, a l-atanamina, a N,N'-dibenziletilenodiamina, a di-hidroabietilamina, as N-alkilo (inferior) piperidinas e qualquer outra amina apropriada.

Como com qualquer grupo genérico de compostos químicos preferem-se certos grupos. Preferem-se os grupos de derivados péptídicos de fórmula geral I em que X representa um átomo de hidrogénio e A uma ligação, aqueles em que os derivados péptídicos de fórmula geral I na qual X representa Get, Mal, Fum e especialmente Suc. Preferem-se também aqueles derivados péptídicos de fórmula geral I em que A_1 representa His-Lys-Thr, Lys-Thr, Thr, Asp-Val-Pro-Lys-Ser, Val-Pro-Lys-Ser, Pro-Lys-Ser, Lys-Ser, Ser, pGlu-Pro-Ser-Lys, Pro-Ser-Lys, Ser-Lys ou Lys.

São especialmente preferidos os derivados péptídicos de fórmula geral I na qual A_1 representa His-Lys-Thr, Lys-Thr ou Thr. Também se preferem os derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_2 representa Asp, e ainda os derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_3 representa Gly, Gln, Asn, Sar e especialmente Ala ou Ser. São ainda preferidos os derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_4 representa Phe assim como aqueles derivados de

fórmula geral I em que A_5 representa Val e em que A_6 representa Gly.

Preferem-se os derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{CH}_2\text{NH}-$ assim como aqueles em que R_1 representa um grupo isobutilo, isto é, 2-metilpropilo e em que R_2 representa um grupo metiltio-etilo, isobutilo ou n-butilo. São especialmente preferidos os compostos em que R_1 e R_2 representam cada um um grupo isobutilo. Os derivados peptídicos mais preferidos de fórmula geral I são $-\text{H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu } \Psi[\text{CH}_2\text{NH}]-\text{Leu-NH}_2$, em que R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo metilo.

Podem preparar-se as proteínas da presente invenção por uma diversidade de processos facilmente determinados pelos técnicos. Estes processos incluem o processo sequencial de fase sólida que pode realizar-se utilizando-se métodos automatizados estabelecidos tais como a utilização de um sintetizador peptídico automático. Para preparar os derivados peptídicos desta invenção, liga-se a um suporte de resina um dipeptido modificado que corresponde ao dipeptido de terminal carbono que apresenta a ligação peptídica modificada ou o seu precursor. Os processos a utilizar para preparar cada uma das ligações peptídicas modificadas são conhecidos dos técnicos e facilmente determinados por um químico desta área dos peptidos. O processo para preparar os derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{NHCO}-$ isto é os compostos $\Psi[\text{NHCO}]$ é conhecido de Chorev e Goodman,

Int. J. Pept. Protein Res., 21(3), 258-68 (1983).

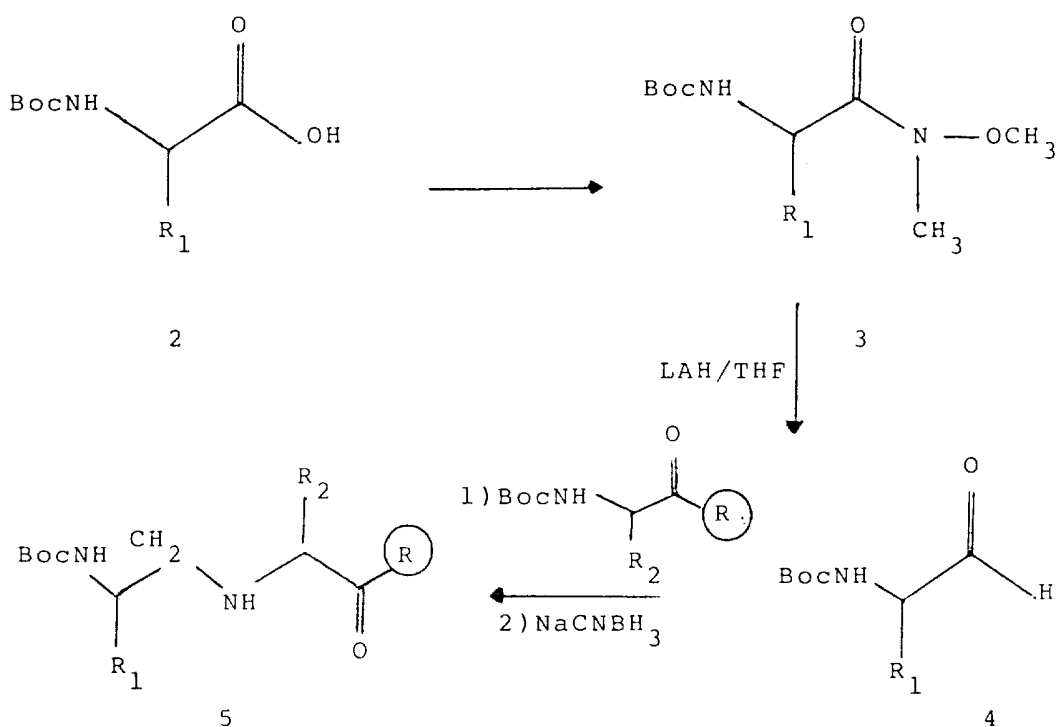
O processo para preparar os derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{COCH}_2-$ ou $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ isto é os compostos $\Psi[\text{COCH}_2]$ e $\Psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2]$ respectivamente é descrito por Holladay e Rich, Tetrahedron Letters, 24(41), 4401-04 (1983). O processo para preparar os derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{CH}_2\text{NH}-$ isto é os compostos $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ é descrito por Sasaki e Coy, Peptides, Vol. 8 pp. 119-121, 1987 e está mais completamente referido posteriormente. O processo para preparar aqueles derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{CH}_2\text{S}-$ isto é os compostos $\Psi[\text{CH}_2\text{S}]$ é descrito por Spatola e Darlak, Tetrahedron Letters, 44(3), 821-33 (1988). O processo para preparar os derivados peptídicos de fórmula geral I em que B representa um grupo $-\text{CH}_2\text{O}-$ isto é os compostos $\Psi[\text{CH}_2\text{O}]$ está descrito por TenBrink, J. Org. Chem., 52,418-22, 1987.

Especificamente os compostos da presente invenção em que B representa um grupo de fórmula geral $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R})$ preparam-se mediante redução do grupo N-metoxi-N-metilamida de fórmula 2 para se obter o aldeído de fórmula 3. A redução pode realizar-se por qualquer procedimento habitual e facilmente determinada pelos técnicos nesta matéria, como por exemplo, mediante utilização de hidreto de alumínio e lítio. Esta redução pode realizar-se de um modo conveniente por meio de adição de cerca de um equivalente molecular de LAH a uma

4.

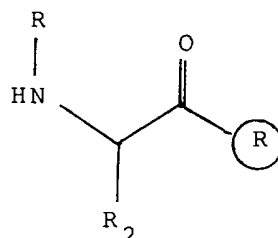
solução arrefecida, habitualmente a 0°C , de um composto de fórmula geral 2 no seio de um solvente não reactivo tal como um solvente etéreo, isto é, por exemplo, tetra-hidrofurano ou éter dietílico.

Após a reacção estar essencialmente completa, normalmente decorridos 30 minutos, a mistura reaccional é diluída mediante adição de, por exemplo, hidrogeno sulfato de potássio ou de sódio a 10% e em seguida a água. Pode isolar-se depois o produto, por exemplo, por extracção da mistura aquosa com um solvente como o éter dietílico, lavagem da fase etérea arrefecida, diluição com ácido clorídrico diluído, secagem e eliminação do solvente. O produto impuro pode-se purificar, por exemplo, em coluna de gel de sílica e eluição com acetato de etilo a 55%/hexano.



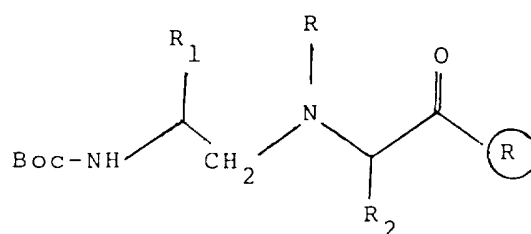
4.

O aldeído de fórmula geral 3 faz-se reagir em seguida com o aminoácido ligado à resina de fórmula geral 6



(6)

na qual R e R₂ têm os significados como definidos para a fórmula geral 1 e em que (R) representa a resina. A base de Schiff que se forma inicialmente é reduzida in situ utilizando-se, por exemplo, cianoboro-hidreto de sódio, para se obter um dipeptido modificado ligado à resina de fórmula geral 7.



(7)

na qual R, R₁ e R₂ têm os significados como definidos para a fórmula geral 1 e (R) representa a resina.

Os aminoácidos representados pelos símbolos de A₆ até A₁ podem ser depois ligados sequencialmente ao dipeptido modificado ligado à resina da fórmula habitual.

As anidas de N-metoxi-N-metilo de fórmula geral 2 preparam-se por forma convencional a partir do corres-

pondente composto N-Boc protegido.

Adiciona-se carbonil-diimidazol à solução seca do aminoácido N-Boc protegido num solvente etéreo como o éter dietílico. A mistura reaccional permanece em agitação durante um tempo compreendido entre 10 minutos e uma hora, normalmente durante 15 a 20 minutos. Adiciona-se cloridrato de N,O-dimetil-hidroxilamina em dimetilformamida e uma amina com impedimento entérico, tal como a diisópropiletilamina e deixa-se a mistura sob agitação durante um período de cerca de 6 até 24 horas à temperatura ambiente. O composto desejado é isolado de seguida por evaporação do solvente e purificação do produto impuro que se pode realizar, por exemplo, por cromatografia rápida em gel de sílica e eluição com cloreto de metilo.

O suporte de resina utilizado pode ser qualquer resina convencional utilizada habitualmente na preparação de polipéptidos de fase sólida, de preferência polistireno previamente preparado por ligação cruzada com 0,5 a cerca de 3% de divinil-benzeno, que fora clorometilado ou hidroximetilado para proporcionar sítios para a formação de éster com o aminoácido α -amino protegido inicialmente introduzido.

O exemplo duma resina hidroximetílica está descrito por Bodanszky, et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966). Está comercializada uma resina clorometilada por Bio Rad Laboratoires, Richmond, California e a preparação

duma resina destas está descrita por Stewart et al., "Solid Phase Péptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), Capítulo 1, pp. 1 a 6. Pode ligar-se o aminoácido protegido à resina pelo processo de Gisin, Helv. Chem Acta, 56, 1476(1973). São comercializadas muitas resinas de ligação a aminoácidos protegidos. Como por exemplo, para se preparar um polipeptido da presente invenção em que a extremidade do terminal carboxilo consiste num residuo Thr, pode utilizar-se um grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc) Thr protegido ligado a uma resina benzilada, hidroximetilada, fenilacetamidometilica (PAM) que é comercializada.

A seguir à ligação do aminoácido α -amino protegido ao suporte de resina, o grupo de protecção é eliminado utilizando-se qualquer processo apropriado, tal como por exemplo, o ácido trifluoroacético em cloreto de metileno, o ácido trifluoroacético apenas, ou ácido clorídrico em dioxano. Realiza-se a desprotecção a uma temperatura compreendida entre 0°C e a temperatura ambiente. Podem-se utilizar outros reagentes de separação padrão e condições para a eliminação dos grupos de protecção α -amino específicos. Após a remoção do grupo de protecção α -amino os outros aminoprotetidos são ligados fase a fase na ordem desejada.

Alternativamente grupos múltiplos de aminoácido podem ligar-se mediante um método de solução antes da ligação com a resina que suporta a sequência de aminoácidos.

O grupo de protecção α -amino utilizado para

4.

cada aminoácido introduzido na sequência polipeptídica pode ser qualquer grupo de protecção conhecido. Entre as classes de grupos de protecção α -amino considerados incluem-se (1) grupos de protecção tipo acilo, tais como: formilo, tri-fluoro-acetilo, ftalilo, tolueno-sulfonilo, tritil-sulfenilo, O-nitrofenoxi-acetilo e α -clorobutirilo; (2) grupos de protecção do tipo uretano aromáticos tais como, benziloxicarbonilo e benziloxicarbonilo substituído tais como p-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenziloxicarbonilo, p-bromobenziloxicarbonilo, p-metoxibenziloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α, α -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonilo e benzidriloxicarbonilo; (3) grupos de protecção uretano alifáticos, tais como: terc-butiloxi carbonilo (Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo e aliloxicarbonilo; (4) grupos de protecção tipo uretano cicloalquilico, tais como, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo e ciclo-hexiloxicarbonilo; (5) grupos de protecção tipo tio-uretano, tais como: feniltiocarbonilo; (6) grupos de protecção tipo alquilo, tais como: trifenilmetilo (tritilo) e benzilo; e (7) grupos trialquilo-silano tais como: trimetilsilano. O grupo de protecção α -amino preferido é o grupo terc-butiloxicarbonilo.

A selecção de um reagente de ligação apropriado é da competência do prito. Um reagente de ligação particularmente apropriado, quando um aminoácido a adicionar é Gln, Asn ou Arg é a N,N'-diisopropilcarbodiimida ou 1-hidroxibenzotriazol. A utilização destes reagentes impede a formação

de nitrilo e de lactama. Outros agentes de ligação são: (1) as carbodiimidas, por exemplo, N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida e N-etil-N'- γ - dimetilaminopropilcarbodiimida; (2) as cianamidas, por exemplo, N,N-dibenzilcianamida; (3) ceteniminas; (4) sais de isoxazolio, por exemplo, N-etil-5-fenil-isoxazolio-3'-sulfonato; (5) compostos monocíclicos azotados contendo amidas heterociclicas de carácter aromático comportando entre um a quatro átomos de azoto no núcleo, tal como os imidazolidos, pirazolidos e 1,2,4-triazolidos.

Amidas heterocíclicas específicas que são utilizáveis incluem o N,N'-carbomildimidazol e N,N-carbomild-di-1,2,4-triazol; (6) acetileno alcoilado, por exemplo, etoxiacetileno; (7) reagentes que formam uma mistura anidra com o radical carbonilo do aminoácido, por exemplo, cloroformato de isobutilo ou o anidrido simétrico do aminoácido que se pretende ligar, por exemplo, Boc-Ala-O-Ala-Boc e (8) compostos heterocíclicos contendo azoto que têm um grupo hidroxil num núcleo azotado, por exemplo, N-hidroxi-ftalimida, N-hidroxi-succinimida e 1-hidroxibenzotriazol. Estão descritos por Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, pp. 1-27 (1970) outros reagentes activantes e a sua utilização na ligação peptídica. Prefere-se a utilização de anidrido simétrico como reagente de ligação para todos os aminoácidos excepto para Arg, Asn e Gln.

Cada aminoácido ou sequência de aminoácidos protegido é introduzida no reactor de fase sólida numa

quantidade quatro vezes superior à necessária e a ligação realiza-se num meio de dimetilformamida: cloreto de metileno a 1:1 ou em dimetilformamida apenas ou de preferência apenas em cloreto de metileno. Nos casos em que ocorre ligação incompleta, o processo de ligação repete-se antes da eliminação do grupo de protecção α -amino, antes da ligação do aminoácido seguinte no reactor de fase sólida. O sucesso da reacção de ligação em cada estágio da síntese é controlado pela reacção da ninidrina como descrita por E. Kaiser et al., *Analyt. Biochem.* 34, 595 (1970).

Após a obtenção da sequência de aminoácidos desejada separa-se o peptido da resina. Esta separação pode efectuar-se por hidrólise tal como mediante tratamento da resina-ligação-poli-peptido com uma solução de dimetilsulfito, p-cresol e tiocresol em ácido fluorídrico anidro.

Como é conhecido na síntese peptídica de fase sólida muitos dos aminoácidos que apresentam grupos funcionais requerem protecção durante a preparação da cadeia. A utilização e selecção dos grupos de protecção apropriados é da competência do técnico nesta matéria e dependerá do aminoácido a proteger e da presença no péptido de outros resíduos de aminoácidos protegidos. A selecção de um destes grupos de protecção de cadeia lateral é critica porque deve ser um grupo que não seja eliminável durante a separação do grupo de protecção do radical α -amino protegido. Por exemplo grupos de protecção da cadeia lateral apropriados para a lisina são os

4.

grupos benziloxicarbonilo e benziloxicarbonilo substituídos, tendo como substituintes átomos ou grupos escolhidos entre halogéneo, por exemplo, cloro, bromo, fluoro e nitro, por exemplo, 2-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenziloxicarbonilo, 3,4-diclorobenziloxicarbonilo, tosilo, t-amiloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo e diisopropilmetoxicarbonilo. O grupo hidroxilo alcoólico da treonina e da serina podem ser protegidos com um grupo acetilo, benzoilo, terc-butilo, tritilo, benzilo, 2,6-diclorobenzilo ou benziloxicarbonilo. O grupo hidroxilo carboxílico do ácido aspártico e do ácido glutâmico pode proteger-se com um grupo benzilo ou ciclo-hexilo. O grupo de protecção preferido é o grupo benzilo.

Estes grupos podem eliminar-se pelos processos correntes. Elimina-se usualmente o grupo de protecção após a síntese da cadeia peptídica estar completa mas os grupos de protecção podem eliminar-se em qualquer outro momento apropriado.

Pode demonstrar-se a capacidade dos derivados peptídicos de fórmula geral 1 para actuarem como antagonistas da neuroquinina A pela capacidade desses peptídeos para competir com a neuroquinina A iodada para os receptores da neuroquinina A dos mamíferos (NK2) utilizando-se o método de Buck, et al., Science 226: 987-989, 1984, para capacidade destes compostos para estimular ou inibir a renovação de fosfatidilinositol induzida pela neuroquinina A utilizando-se o método de Bristow, et al., British J. Pharmacol. 90:211-21,

1987 ou para antagonizar a contracção muscular lisa induzida pela neuroquinina A utilizando-se o método de Dion, et al., Life Sciences 41:2269-2278, 1987.

Devido à capacidade dos derivados peptídicos da presente invenção actuarem como antagonistas da neuroquinina A os compostos são utilizáveis como imunodepressores e no tratamento de artrite, asma, ardor, inflamação, desenvolvimento de tumor, hipermotilidade gastro-intestinal, doença de Huntingtónis, psicose, neurite, neuralgia cefaleia incluindo a enxaqueca, hipertensão, incontinência urinária, urticária, sintomas da síndrome carcinoide, influênzia e resfriamento vulgar.

Os técnicos determinam facilmente doses eficazes por via oral ou parentérica podem ser determinadas facilmente pelo técnico e consistem em doses que provocam o antagonismo do receptor de neuroquinina A (NK2). Por exemplo doses eficazes de péptidos da presente invenção podem estar compreendidos entre cerca de 0,5 μ g/kg e cerca de 500 mg/kg por massa corporal do doente e por dia. Os compostos são administrados de um modo conveniente sobre a forma de doses unitárias contendo entre cerca de 1 mg a cerca de 500 mg de composto activo e podem ser administradas de uma a quatro ou mais doses unitárias por dia. O termo "doente" utilizado aqui refere-se a mamíferos, tais como os primatas, incluindo seres humanos, carneiros, cavalos, gado, porcos, cães, gatos, ratos e murganhos.

Ainda que alguns derivados peptídicos possam sobreviver à passagem através do intestino após administração oral, prefere-se a administração não oral, por exemplo subcutânea, endovenosa, intramuscular ou intraperitoneal; administração por injeção depósito, por preparação de um implante ou por aplicação às membranas mucosas, tais como à membrana do nariz, da garganta ou dos tubos brônquicos, por exemplo, sob a forma de aerossol que pode conter um derivado peptídico da presente invenção sob a forma de uma aspersão ou de um pó seco.

Para administração por via parentérica os compostos podem administrar-se como doses injectáveis de uma solução ou suspensão do composto, num solvente aceitável sob o ponto de vista fisiológico com um veículo farmacêutico que pode ser um líquido estéril tal como a água ou óleos com ou sem adição de um agente tensioactivo ou de outros adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Óleos representativos que podem ser utilizados nestas preparações são os provenientes da parafina, óleos animais, óleos vegetais ou óleos de origem sintética, por exemplo óleo de amendoim, óleo de soja e óleo mineral. Em geral preferem-se veículos líquidos como água, solução de cloreto de sódio, dextrose aquosa e açúcares em solução relacionados com esta, etanol e glicóis como o propilenoglicol ou o polietilenoglicol, particularmente para soluções injectáveis.

Os compostos podem ser administrados sob a

forma de uma injeção depósito ou de um implante que pode ser preparado de tal modo a permitir a libertação controlada do ingrediente activo. O ingrediente pode ser comprimido em grânulos ou em pequenos cilindros e implantado por via subcutânea ou intramuscular sob a forma de injeções depósito ou de implantes. Os implantes podem utilizar substâncias inertes tais como os polímeros biodegradáveis ou os silicones sintéticos, por exemplo, "silastic", borracha de silicone preparada pela Dow-Corning Corporation.

Exemplos

A presente invenção é ilustrada através dos exemplos não limitantes seguintes.

Exemplo 1

Antagonismo para o receptor da neuroquinina A por H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu- Ψ [CH₂NH]-Leu-NH₂ e H-Asp-Ser-Phe-Gly-Leu- Ψ [CH₂N(CH₃)]-Leu-NH₂ como se demonstra pelo efeito sobre a reposição de fosfatidilinositol.

Reuniram-se diversas bexigas provenientes de murganhos, cortadas e homogeneizadas em 50 mM Tris-ACl (pH 7,4) contendo 120 mM de NaCl e 5 mM KCl à temperatura de 4⁰C e centrifugadas a 48 x g durante 15 minutos. O aglomerado suspendeu-se durante 30 minutos em 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 10 mM de EDTA e 300 mM de KCl à temperatura de 4⁰C. Centrifugou-se a suspensão como anteriormente e lavaou-se o aglomerado duas vezes em 50 mM Tris-HCl simples (pH 7,4) e centrifugou-se de um modo idêntico. Em seguida fez-se a sus-



pensão do tecido em tampão de incubação e adicionou-se uma alíquota (aproximadamente 3 a 5 mg de tecido) em cada tubo de ensaio para se iniciar o ensaio. Os tubos de ensaio continham tampão de incubação constituído por 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,02% de BSA, 40 μ g/ml de bacitracina, 4 μ g/ml de quimostetina, 4 μ g/ml de leupeptina, 2 mM de $MnCl_2$, 0,1 nM de 125 iodo-histidilo-neuroquinina A (Amersham Corp.) e concentrações dos compostos em epígrafe ou dos padrões, variando entre 0,03 nM e 100 μ M. Para se atingir o equilíbrio deixou-se o ensaio processar-se durante 120 minutos à temperatura ambiente. Após este período, os conteúdos de cada tubo foram rapidamente filtrados por filtros Whatman GF/B pré-humedecidos com BSA 0,5% e lavaram-se os filtros rapidamente duas vezes com 50 mM Tris-HCl simples arrefecido com gelo a pH 7,4.

A radioactividade ligada ao filtro foi quantificada por um contador-gama. A ligação específica (máxima) definiu-se com uma diferença entre a ligação na presença e na ausência de 1 μ M de neuroquinina A não marcada. A competição entre a ligação de neuroquinina A iodada e os compostos em ensaio ou os padrões expressou-se sob a forma de percentagem desta competição máxima. Os valores de CI_{50} (concentração requerida para inibir 50% da ligação com o receptor) verificaram-se ser da ordem de 100 a 200 nM para os compostos em epígrafe (Fig. 1).

Exemplo 2

Antagonismo para o receptor de neuroquinina A por H-Zsp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu- Ψ [CH₂NH]-Leu-NH₂ e H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu- Ψ [CH₂N(CH₃)]-Leu-NH₂, como demonstrado pelo efeito sobre a reposição de fosfatidilinositol.

Reuniram-se as bexigas de diversos murganhos e fizeram-se cortes de 350 μ m com um cortador de tecido. O tecido cortado foi em seguida incubado em tampão de Krebs-Hepes a 37°C com mudanças de tampão recente, cada 15 minutos durante 30 minutos. Em seguida incubou-se o tecido neste tampão contendo 100 a 200 uCi de 3H-inositol à temperatura de 37°C. Em seguida lavou-se o tecido e incubou-se durante mais 30 minutos em tampão Krebs-Hepes contendo 10 mM de Li⁺, à temperatura de 37°C com mudança para tampão recente de 15 em 15 minutos. As porções de massa tecidular, aproximadamente 10 a 20 mg por tubo de ensaio foram depois colocadas em tampão de lítio, e adicionado o composto em ensaio, 25 μ l e em seguida várias concentrações de neuroquinina A, 25 μ l, para um volume final de 250 μ l. Avaliou-se o composto em ensaio com concentrações variando desde 1 nM até 100 μ M e as concentrações de neuroquinina A variando entre 1 nM e 10 μ M. Também se avaliou o composto em ensaio isoladamente nas concentrações para o teste da actividade agonista. Após 30 minutos à temperatura ambiente, determinou-se a reposição de fosfatidilinositol por adição de 940 μ l de cloroformio: metanol a 1:2, seguido de 310 μ l de cloroformio e depois de 310 μ l de água.

Em seguida cada tubo foi submetido a agitação turbilhonar durante 15 segundos e depois centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos para separação das fases. Em seguida impregnaram-se 900 μ l da fase superior (aquosa) numa coluna de permuta iónica (formato) Biorad AG-1X8 de 0,5 ml. Retiraram-se 50 μ l da fase inferior (cloroformio) de cada tubo e colocaram-se numa ampola de contagem, seca, e contou-se o fluido de cintilação. O material das colunas lavou-se na ordem seguinte:

- 1) 10 ml de água.
- 2) 5 ml de mM tetraborato dissódico/160 mM de formato de sódio.
- 3) 10 ml de formato de amónio 1 M em ácido fórmico 0,1 M.

Recolheu-se a lavagem final (a terceira) e misturou-se um ml com 6 ml de líquido de cintilação ACS e contou-se. A relação destas contagens (total de fosfatos de inositol) com as contagens da fase orgânica correspondente foi calculada em seguida para cada amostra. As relações na presença do composto em ensaio e/ou dos padrões foram depois comparadas com as relações com os tubos de controlo, isto é, sem agonista estimulante. Construíram-se as curvas dose-resposta e determinaram-se as capacidades dos compostos em ensaio para estimularem ou inibirem a reposição de fosfatidilinositol induzida por neuroquinina A mediante análise gráfica ou com auxílio de um programa computadorizado; representam-se nas Figuras 2 e 3.

4.

Exemplo 3

Preparação da contracção de bexiga de murganho

Meias tiras de bexigas provenientes de murganhos Syrian machos dourados (75 a 100 g) suspenderam-se em tampão de Tyrode à temperatura de 31°C e com 1 g de tensão de repouso como descrito por Dion et al. (Life Sciences 41; 2269-2278, 1987). Adicionou-se ao tampão o inibidor de encefalinase, tiorfan, a 10 µM, 15 minutos antes da adição de cada composto em ensaio. As curvas dose-resposta a NKA cumulativas construíram-se primeiro na ausência e em seguida na presença do composto em ensaio.

Adicionaram-se cumulativamente os compostos em ensaio para determinar se estes tinham ou não efeitos de contracção. Antes de se adicionar a concentração cumulativa seguinte, deixou-se aplanar qualquer efeito observado do composto em ensaio. Sob estas condições a CE₅₀ para os efeitos de concentração de NKA foi geralmente de 10 nM, o que está em boa concordância com os valores da bibliografia. Os resultados de contracção são expressos pelos valores da tensão desenvolvida acima ou abaixo da tensão de repouso. Em tecidos de bexiga de três murganhos separados o composto H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH)Leu-NH₂ ou H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂N(CH₃)Leu-NH até concentrações de 10 µM não produziu qualquer contracção. As figuras 4 e 5 representam a força contractil como uma função da concentração de NKA sem e com a presença do composto em ensaio.

Exemplo 4

I. Síntese de Boc-Leu-aldeído (Fehrentz, J.-A. e Castro, B. Synthesis, 676-678, 1983);

A. N-metoxi-N-metilamida de N-t-Boc-Leucina.

Dissolveram-se 15,0 mmoles de hidrato de Boc-Leucina em 30 ml de éter anidro. Secou-se a solução com sulfato de magnésio anidro e eliminaram-se os sólidos por filtração. Adicionaram-se 16,5 mmoles de carbonildiimidazol ao filtrado e agitou-se a reação durante 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se à solução resultante uma suspensão de 22,5 mmoles de uma suspensão de cloridrato de O,N-dimetil-hidroxilamina em 15 ml de dimetilformamida e 3,9 ml de diisopropiletilamina. Agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente. Diluiu-se a reação com acetato de etilo 75 ml e lavou-se com 3 x 40 ml de ácido clorídrico 1N arrefecido com gelo, 3 x 40 ml de hidrogênio carbonato de sódio saturado e 1 x 40 ml de cloreto de sódio saturado. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio, filtrou-se e eliminou-se o acetato de etilo sob vácuo.

Dados analíticos: R_f (silica gel F254) : 0.51 (acetato de etilo/hexano 3/2); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) TMS int) : δ =0.95 ppm (2D, 6H, J=6.6 Hz); 1.42 (s, 11H); 1.64-1.80 (m, 1H); 3.20 (s, 3H); 3.80 (s, 3H); 4.72 (m, 1H); 5.10 (d, 1H, J=7.5 Hz). Mass. Spec: $\text{M}+\text{H}^+$: Teórico: 275. Observado: 275.

B. Aldeído de Boc-Leucina:

Dissolveram-se 2,5 mmoles de N-metoxi-W-

-metilamida de Boc-leucina em éter dietílico anidro, 30 ml. Adicionaram-se a esta solução 3,2 mmoles de hidreto de alumínio e lítio (solução 1M em tetra-hidrofurano). Agitou-se a reacção durante 20 minutos à temperatura ambiente e diluiu-se cuidadosamente por adição de uma solução de hidrogeno sulfato de sódio (0,6 g) em 10 ml de água. Adicionou-se a mistura reaccional a 75 ml de éter dietílico e lavou-se com ácido clorídrico 1N arrefecido com gelo, 3 x 30 ml, solução saturada de hidrogeno carbonato de sódio, 3 x 30 ml e solução saturada de cloreto de sódio, 1 x 30 ml. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio filtrou-se e eliminou-se o solvente no vácuo.

Resultados analíticos: Rf (sílica gel 60 F 254) : 0,68 acetato de etilo/hexano 3/2. Espectro de massa: $M = H^+$: Teórico: 216. Observado 216.

II: Síntese de Resina-Leu:

Utilizaram-se técnicas de síntese peptídica de fase sólida padrão num sintetizador de peptídeos automático. Após a formação de Boc-Leu-resina (0,5 mmoles), eliminou-se o grupo de protecção Boc e lavou-se a resina com dimetilformamida, diclorometano e secou-se.

III. Formação de ligação amida reduzida

(Leu Ψ [CH₂NH]):

Dissolveram-se 2 mmoles de Boc-Leu aldeído em ácido acético a 1% em dimetilformamida (10 ml) e introdu-

ziu-se esta solução num reactor contendo resina-Leu (0,5 mmoles, ver II, citado antes). Adicionou-se a esta mistura uma solução de NaCNBH_3 (150 mg) em 2 ml de dimetilformamida. Agitou-se a mistura durante 4 horas e decantou-se o reactor, lavou-se a resina com dimetilformamida e em seguida com diclo metano.

IV. Síntese de $[\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]^9, \text{Leu}^{10}] \text{NKA}_{4-10}$:

A síntese do peptido completou-se num sintetizador de peptidos automático por adição sequencial dos aminoácidos restantes (Gly, Val, Phe, Ser (bz1) e Asp (Chx1)). O peptido separou-se da resina e desprotegeu-se globalmente utilizando-se ácido fluorídrico anidro-anisol a 10:1. Purificou-se o peptido utilizando-se técnicas de HPLC de fase inversa. Dados analíticos: Análise de aminoácidos: (Digesto de HCl) Asp (1,03); Ser (0,93); Gly (1,01); Val (0,96); Phe (0,74). Conteúdo peptídico= 53,4%. Espectrometria de massa bombardeamento atómico rápido: $\text{M}+\text{H}^+$. Teorico: 735. Observado 735.

V. Síntese de $[\Psi[\text{CH}_2\text{NCH}_3]^9, \text{Leu}^{10}] \text{NKA}_{4-10}$:

Fez-se reagir N-metil-Leu-resina (0,5 mmoles), (preparada a partir de Boc-N-metil leucina de acordo com o processo descrito no ponto II) com 0,2 mmoles de Boc-Leu aldeido como descrito no ponto III anterior. A síntese peptídica copletou-se em seguida como descrito no ponto IV anterior.

4.

Dados analíticos: Análise de aminoácidos (digesto de HCl) Asp (1,01); Ser (0,89); Gly (1,02); Val (1,00); Phe (0,98).

Conteúdo peptídico+ 53,5%. Espectrometria de massa bombardeamento atômico rápido: $N+H^+$. Teórico 749. Observado 749.

VI. Síntese de $[\Psi[CH_2NCH_2R]^9, Leu^{10}]NKA_{4-10}$:

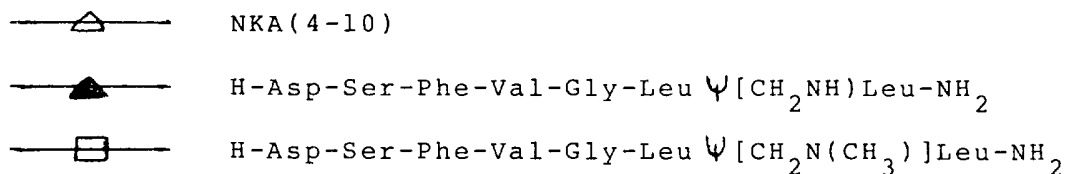
Preparou-se a resina Boc-Leu $[\Psi(CH_2NH)-Leu$ de acordo com as fases II e III anteriores. Em seguida fez-se reagir a resina com 2,5 mmoles de R-CHO em 10 ml de HOAC a 1% em dimetilformamida na presença de $NaCNBH_3$ como descrito no ponto III anterior. A síntese do peptido completou-se depois como descrito no ponto IV referido anteriormente.

Explicação das Figuras

A Figura 1 representa a capacidade de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu $\Psi[CH_2NH]Leu-NH_2$ e H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu $\Psi[CH_2NCH_3]Leu-NH_2$ para antagonizar a ligação ao receptor de NKA demonstrado pela capacidade do composto em ensaio para deslocar NKA marcada com I125 na bexiga urinária do murganho (Exemplo 1). A abcissa (eixo do X) indica logaritmicamente a concentração em nanomoles de agonista ou de antagonista do receptor de neuroquinina A (NKA). A ordenada (eixo do Y) indica a ligação específica observada para cada agonista testado ou antagonista avaliada sob a forma de percentagem de ligação específica máxima.

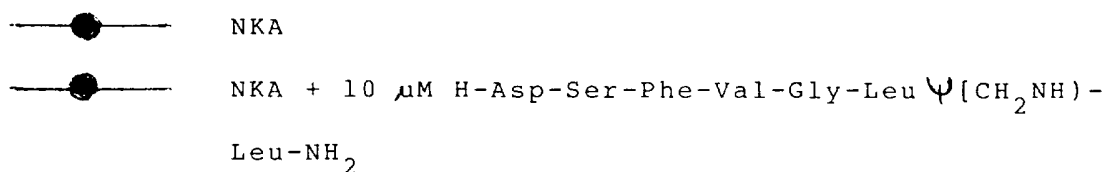
—○— NKA
—●— NKA(3-10)

4.



Os agonistas ensaiados foram NKA e fragmentos de NKA constituídos por os aminoácidos de NKA do terceiro ao décimo (3-10) e os aminoácidos de NKA do quarto ao décimo (4-10). Os valores são a média $\pm$ EPM de 6 a 12 experiências. Os valores de CI₅₀ avaliaram-se graficamente a partir do ponto de inibição de 50%.

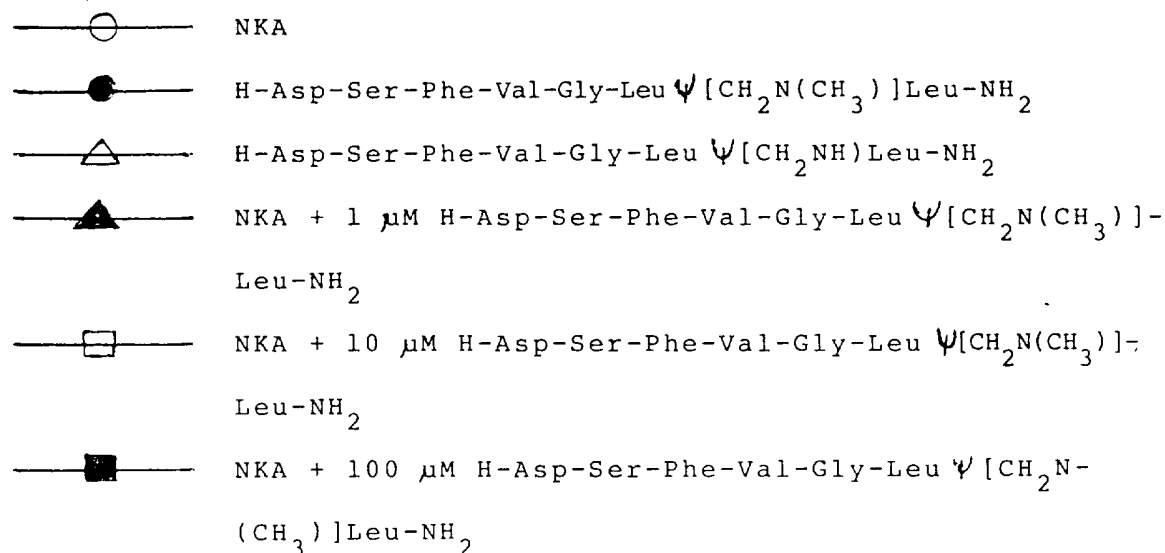
A Figura 2 representa a capacidade de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂ para antagonizar a ligação ao receptor de NKA como demonstrado pelo efeito sob a reposição de fosfatidilinositol (PI) em bexiga de murganho (Exemplo 2). As abcissas (eixo do X) indicam logaritmicamente a concentração em nanomoles (nM) de agonista ou de antagonista do receptor de NKA. As ordenadas (eixo do Y) indicam a reposição de PI observada sob a forma de percentagem do controlo.



10 μ M de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂ produziu uma variação em direcção à direita significativa da curva dose-resposta de NKA de um modo competitivo. Os valores são a média $\pm$ E.P.M. de experiências em triplicado.

4

A Figura 3 representa a capacidade de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NCH₃]Leu-NH₂ (MDL29916) para antagonizar a ligação ao receptor de NKA como demonstrado pelo efeito sobre a reposição de fosfatidilinositol (PI) na bexiga do murganho (Exemplo 2). As abcissas (eixo do X) indicam logaritmicamente a concentração em nanomoles (nM) de agonista ou de antagonista do receptor de NKA. As ordenadas (eixo do Y) indicam a reposição de PI observada sob a forma de uma percentagem do controlo.



1, 10 e 100 μ M de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂N(CH₃)]Leu-NH₂ produziram uma variação significativa para a direita da curva dose-resposta de NKA de um modo significativo. O plano de Schild destes dados tem uma inclinação de menos 0,99 indicando antagonismo competitivo e p_{H2} de 7,66. Até 100 μ M de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂N(CH₃)]Leu-NH₂ apresentam apenas actividade agonista parcial 5% e H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂ apresentam apenas actividade agonista parcial

4.

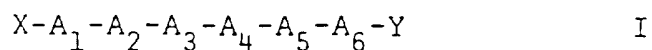
de 12%. Os valores são a média $\pm$ E.P.M de experiências em triplicado.

A Figura 4 representa o efeito antagonista de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂ sobre a actividade contráctil mediada por NKA em preparações de bexiga de murganho (Exemplo 3). As abcissas (eixo do X) indicam logaritmicamente a concentração nanomolar (nM) de NKA ou de NKA conjuntamente com 10 μ M de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂. Os valores são a média $\pm$ E.P.M. de experiências em triplicado.

A Figura 5 representa o efeito antagonista de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂NH]Leu-NH₂ sobre a actividade contráctil induzida por NKA em preparação de bexiga de murganho (Exemplo 3). As abcissas (eixo do X) indicam logaritmicamente a concentração nanomolar (nM) de NKA ou de NKA conjuntamente com 10 μ M de H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu Ψ [CH₂N-(CH₃)]Leu-NH₂. Os valores são a média $\pm$ E.P.M. de uma experiência em triplicado.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S -----

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



na qual

X representa um átomo de hidrogênio, um grupo alquilo com 1 a 6 átomos de carbono ou um grupo acilo com 2 a 10

átomos de carbono;

A₁ representa uma ligação ou um grupo contendo de 1 a 4 aminoácidos;

A₂ representa uma ligação, Asp ou Glu;

A₃ representa aminoácido qualquer;

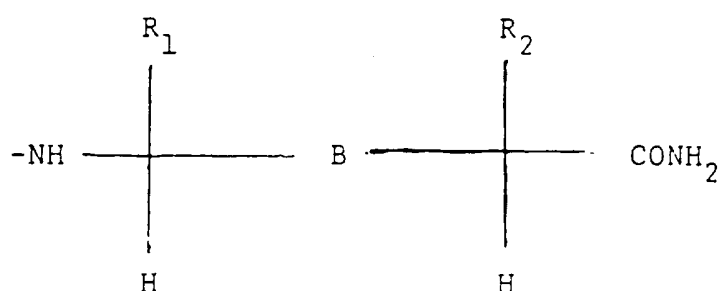
A₄ representa Phe ou N-Me-Phe;

BAD ORIGINAL

A_5 representa Ile, Val, Leu, Phe, Ala, Tyr, Nle, Met, ou N-Me-Val;

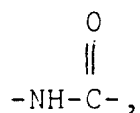
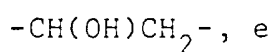
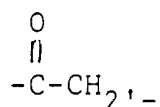
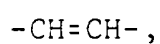
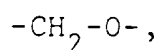
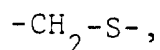
A_6 representa Gly ou Sar: e

Y representa um grupo de fórmula geral



na qual

B representa um grupo de fórmula geral $-CH_2-\underset{\substack{| \\ R}}{N}-$, ou de uma das fórmulas:



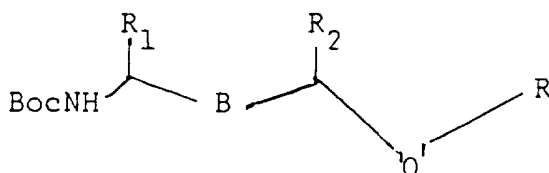
em que

R representa um átomo de hidrogênio ou um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono ou fenilalquileno em que o grupo alquileno, de cadeia linear ou ramificada comporta de 1 a 6 átomos de carbono e o grupo fenileno compor,

facultativamente um substituinte escolhido entre um átomo de halogéneo ou um grupo alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} ou hidroxí

R_1 e R_2 representam, cada um, independentemente um grupo isopropilo, isobutilo, sec-butilo, n-butilo ou 2-(metil-tio)etilo;

e dos seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, caracterizado pelo facto de se ligar ao composto ligado à resina de fórmula



na qual R_1 , R_2 e B têm os significados definidos antes, e Boc representa o grupo de protecção butiloxicarbonilo e JOR (rodeado por um círculo) representa a resina, na ordem de A_6 para A_1 , aminoácidos alfa-amino-protégidos ao grupo amino-terminal da cadeia peptídica em crescimento que, entretanto, foi exposta por eliminação dos grupos amino-protectores.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I, na qual X representa um átomo de hidrogénio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a prepara-

ção de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_1 , representa uma ligação e X representa Glt, Mal, Fum ou Suc, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_1 representa uma ligação e X representa Suc, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_1 representa His-Lys-Thr, Lys-Thr, Thr, Asp-Val-Pro-Lys-Ser, Val-Pro-Lys-Ser, Pro-Lys-Ser, Lys-Ser, Ser, pGlu-Pro-Ser-Lys, Pro-Ser-Lys, Ser-Lys, ou Lys, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_1 representa His-Lys-Thr, Lys-Thr ou Thr, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_2 representa Asp, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos

iniciais correspondentemente substituídos.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_3 representa Gly, Gln, Asn, Sar, Ala ou Ser, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_3 representa Ala ou Ser, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_4 representa Phe, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_5 representa Val, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_6 representa.

Gly, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual B representa um grupo de fórmula geral $-\text{CH}_2\text{N}-$, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual R_1 representa um grupo isobutilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual R_2 representa um grupo 2-metil-tio-etilo, isobutilo ou n-butilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual R_1 e R_2 representam cada um, um grupo isobutilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

17.- Processo de acordo com a reivindicação I, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual X representa um átomo de hidrogénio, um grupo Glt, Mal, Fum ou Suc, A_1 representa uma ligação ou His-Lys-Thr, Lys-Thr, Thr, Asp-Val-Pro-Lys-Ser, Val-Pro-Lys-Ser, Pro-Lys-Ser, Lys-Ser, Ser, pGlu-Pro-Ser-Lys, Pro-Ser-Lys, Ser-Lys, ou Lys; A_2 representa uma ligação Asp, ou Glu; A_3 representa Gly, Gln, Asn, Sar, Ala, ou Ser; A_4 representa Phe ou N-Me-Phe; A_5 representa Ile, Val, Leu, Phe, Ala, Tyr, Nle, Met, ou N-Me-Val; A_6 representa Gly ou Sar; B representa $-CH_2NH-$; e R_1 e R_2 representam, cada um, independentemente, um grupo isopropil, isobutilo, sec-butilo, n-butilo ou 2-(metil-tio)etilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual X representa um átomo de hidrogénio, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_1 representa uma ligação, His-Lys-Thr, Lys-Thr ou Thr, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_2 representa uma ligação ou Asp, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual X representa um átomo de hidrogénio, A_1 representa His-Lys-Thr, Lys-Thr ou Thr, e A_2 representa Asp, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_3 representa Ala ou Ser, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 17 para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_4 representa Phe, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_5 representa Val, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

25.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual A_6 representa Gly, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual B representa um grupo de fórmula geral $-CH_2\overset{\underset{R}{|}}{N}-$, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

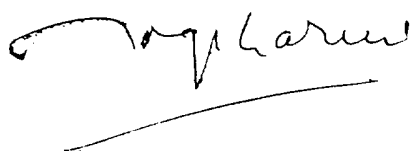
27.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual R_1 representa um grupo sec-butilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

28.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmula geral I na qual R_2 representa um grupo 2-(metil-tio)etilo, sec-butilo ou n-butilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

29.- Processo de acordo com a reivindicação 17, para a preparação de derivados peptídicos de fórmulas $H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-\overset{\overset{Y}{|}}{CH_2NH}/Leu-NH_2$ ou $H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-\overset{\overset{Y}{|}}{CH_2N-(CH_3)}/Leu-$

-NH₂, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos,

Lisboa, 19 de Junho de 1989
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

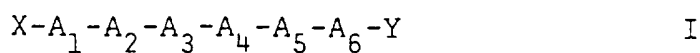


BAD ORIGINAL

R E S U M O
=====

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS
PEPTÍDICOS COM ACTIVIDADE ANTAGONISTA DA NEURO
QUININA A"

Descrevem-se novos derivados peptídicos de fórmula geral

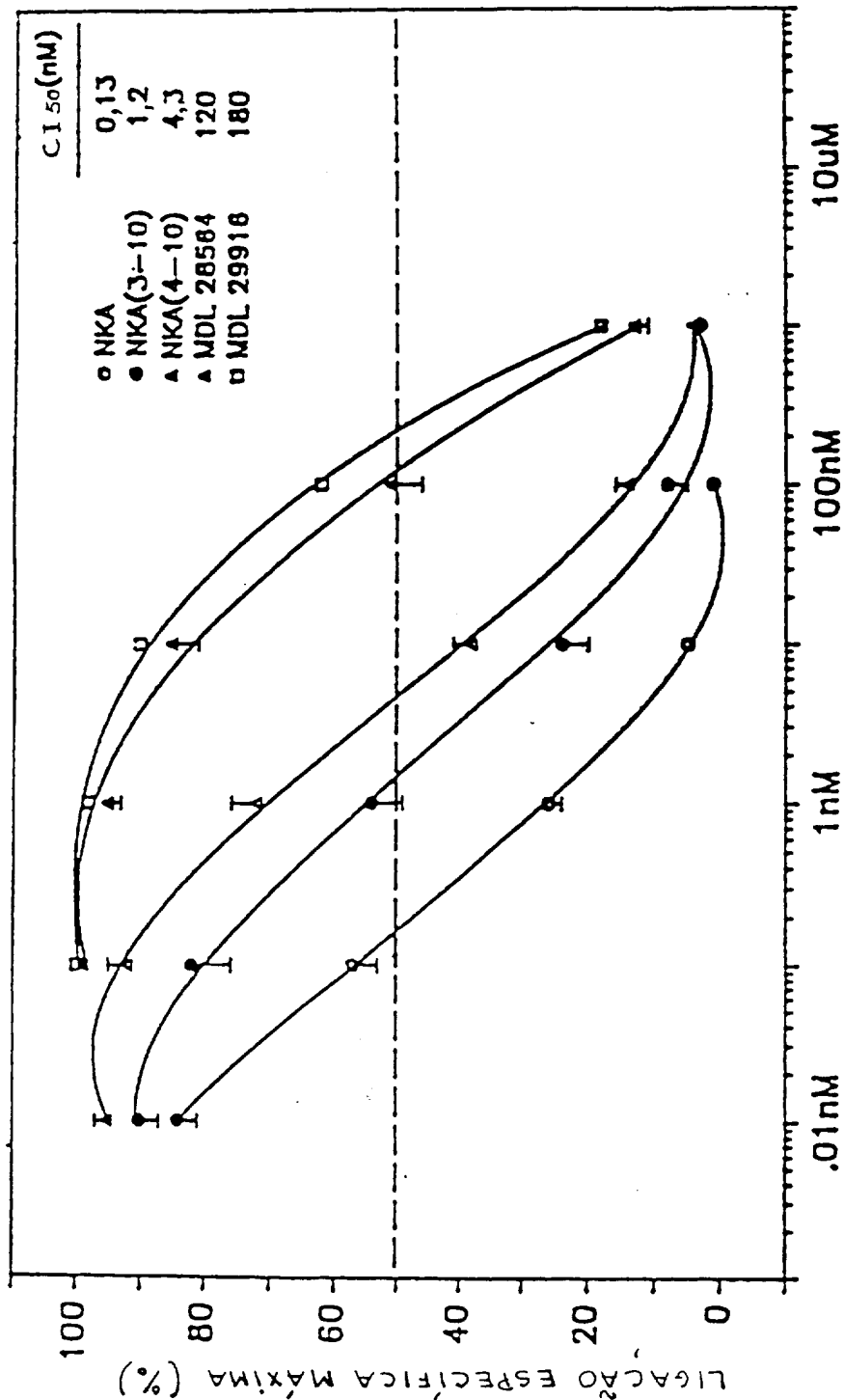


assim como um processo para a sua preparação ou para a preparação dos seus sais, por intermédio de uma resina de suporte e que consiste em se formar, desde A_6 até A_1 , a cadeia peptídica em crescimento por ligação dos aminoácidos α -amino-protégidos ao grupo amino-terminal e subsequente eliminação dos grupos amino-protectores.

Os novos derivados peptídicos obtidos deste modo apresentam actividade antagonista da neuroquinina A a qual foi confirmado mediante aplicação de ensaios de ligação competitiva e ensaios bioquímicos convencionais assim como de testes fisiológicos convencionais e de utilização dos derivados citados sob uma diversidade de condições em cuja neuroquinina A está envolvida.

[Handwritten signature]

COMPETIÇÃO DE $[^{125}\text{I}]$ NKA EM BEXIGA DE MURGHANO

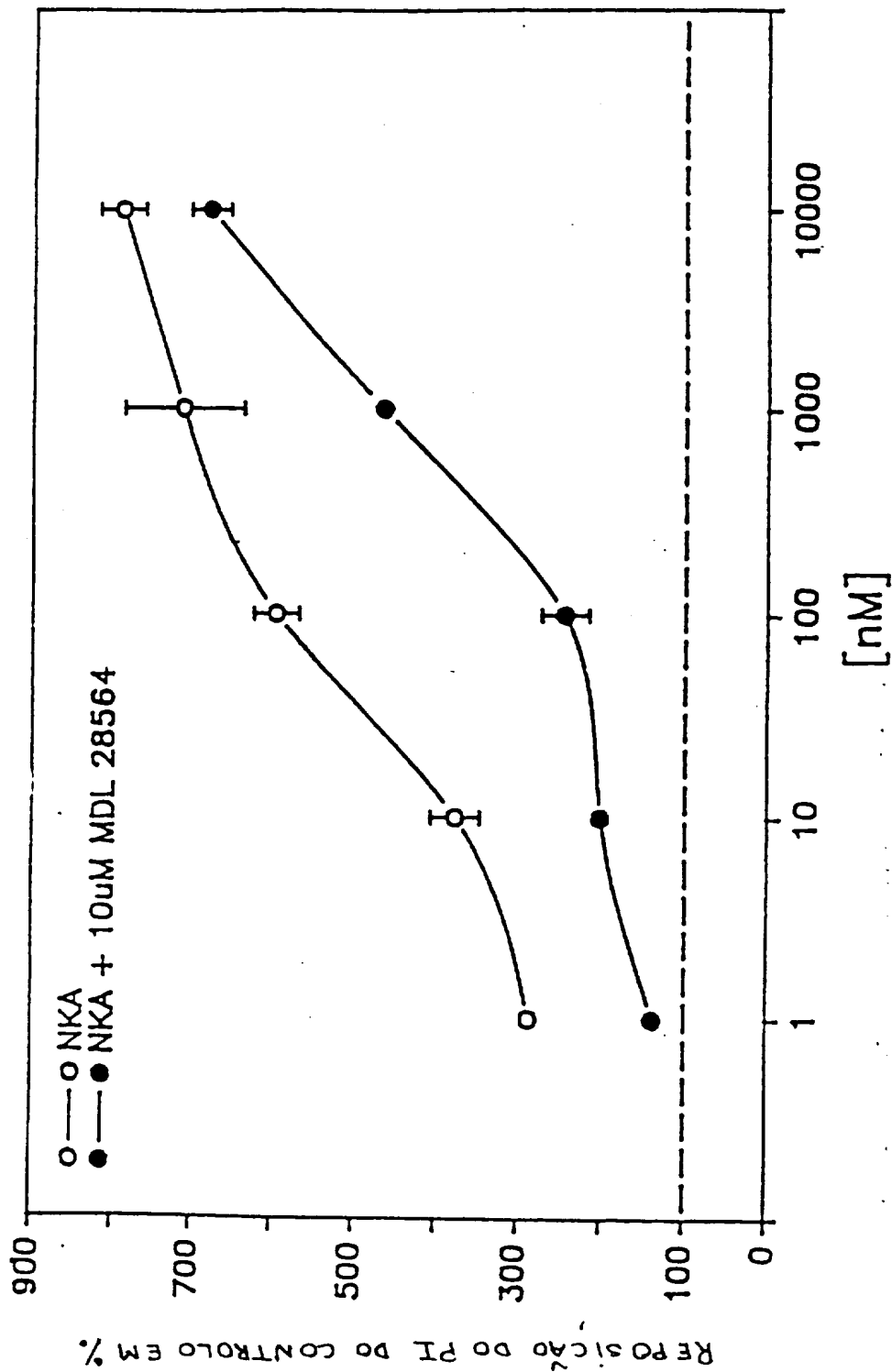


CONCENTRAÇÃO PEPTÍDICA

INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DE NKA IODADA NA BEXIGA DO MURGHANO.
 $\text{MDL 28'564} = \text{LEU}^9 - \text{CH}_2\text{NH} - \text{LEU}^{10} - \text{NKA}(4-10)$. $\text{MDL 29916} = \text{LEU}^9 - \text{CH}_2\text{NCH}_3 - \text{LEU}^{10} - \text{NKA}(4-10)$. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ E.P.M. DE 6-12 EXPERIÊNCIAS. OS VALORES DE CI_{50} ESTÃO AVALIADOS GRÁFICAMENTE A PARTIR DO PONTO CORRESPONDENTE A 50% DE INIBIÇÃO.

FIGURA 1

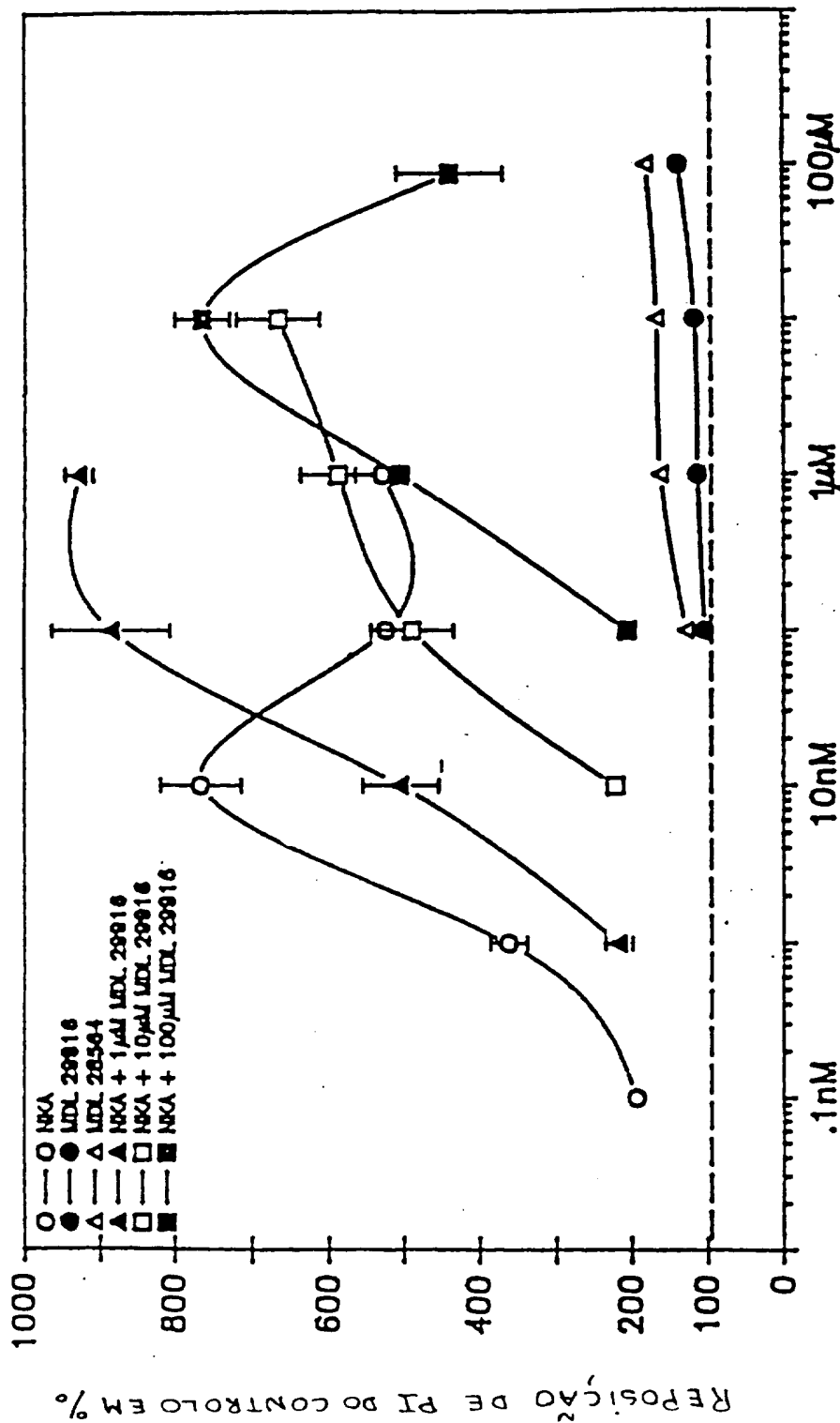
REPOSIÇÃO DE PI NA BEXIGA DO MURGANHO



ANTAGONISMO DE MDL 28564 SOBRE A REPOSIÇÃO DE FOSFATIDILINOSITOL (PI) ESTIMULADO POR NKA. 10 µM DE MDL 28564 PRODUZIRAM UMA VARIAÇÃO EM DIRECÇÃO À DIREITA SIGNIFICATIVA DE NKA NA CURVA DOSE RESPOSTA DE UM MODO COMPETITIVO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE EXPERIÊNCIAS EM TRIPLICADO

FIGURA 2.

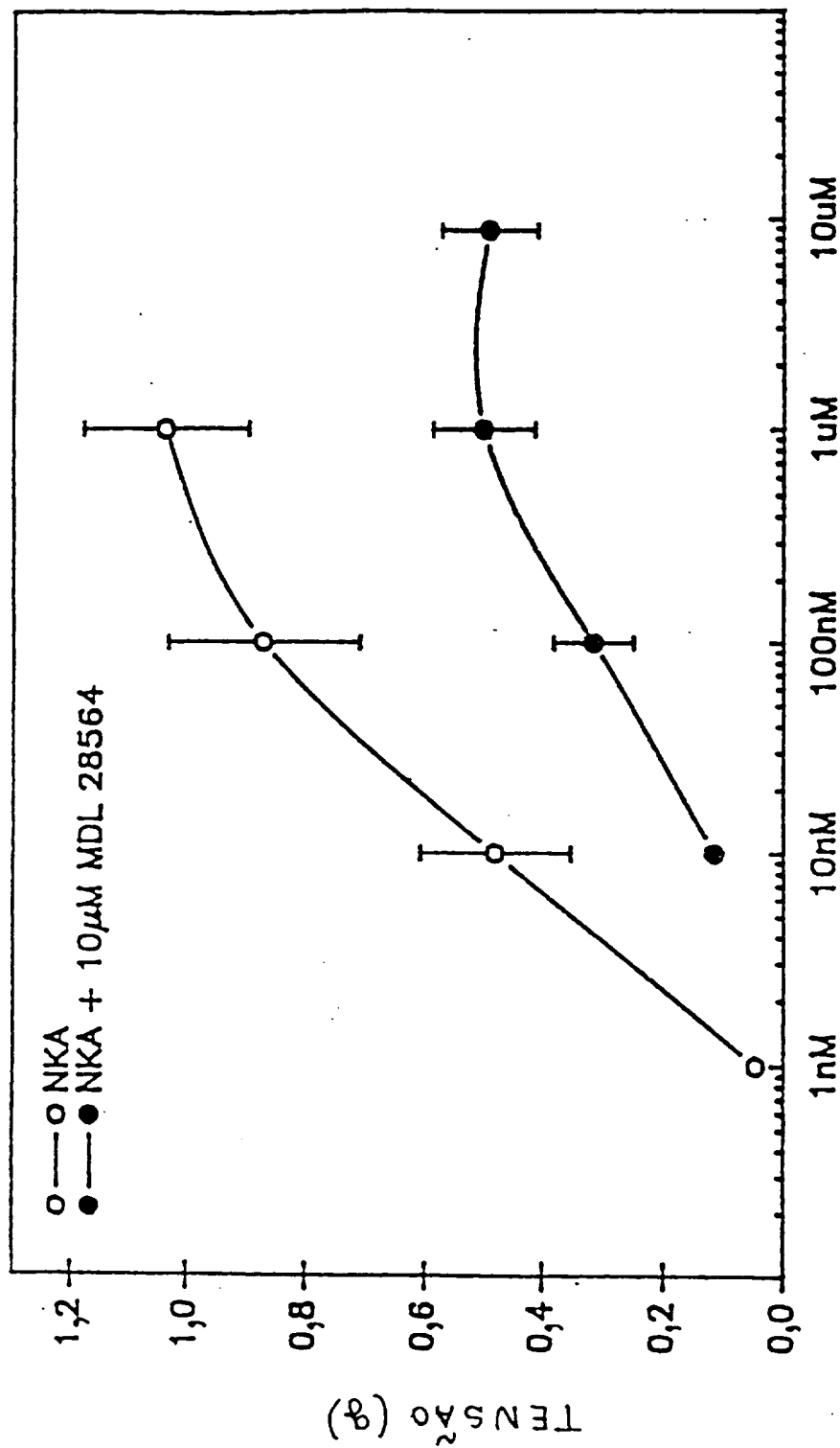
REPOSIÇÃO DE PI NA BEXIGA DO MURGANHO



ANTAGONISMO DE HDL 29916 NA REPOSIÇÃO DE PI ESTIMULADO POR NKA.

1,10 e 100 µM de HDL 29916 PRODUZIRAM UMA VARIAÇÃO EM DIRECÇÃO À DIREITA DEPENDENTE DA DOSE NA CURVA DOSE RESPOSTA DE NKA. O PLANO DE SCHILD DESTES DADOS APRESENTAM UMA INCLINAÇÃO DE MENOS 0,99 INDICANDO ANTAGONISMO COMPETITIVO PA₂ DE 7,66. HDL 29916 ATÉ 100 µM APRESENTA APENAS A ACTIVIDADE AGONISTA PARCIAL DE 5%. E HDL 28564 APRESENTOU APENAS ACTIVIDADE AGONISTA PARCIAL DE 12%. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± EPH DE EXPERIÊNCIAS EN TRIPPLICADO

EFEITO DE HDL 28564 SOBRE A ACTIVIDADE CONTRÁCTIL INDUZIDA POR
NKA NAS PREPARAÇÕES DE BEXIGA DE MURGANHO
($n=3$)

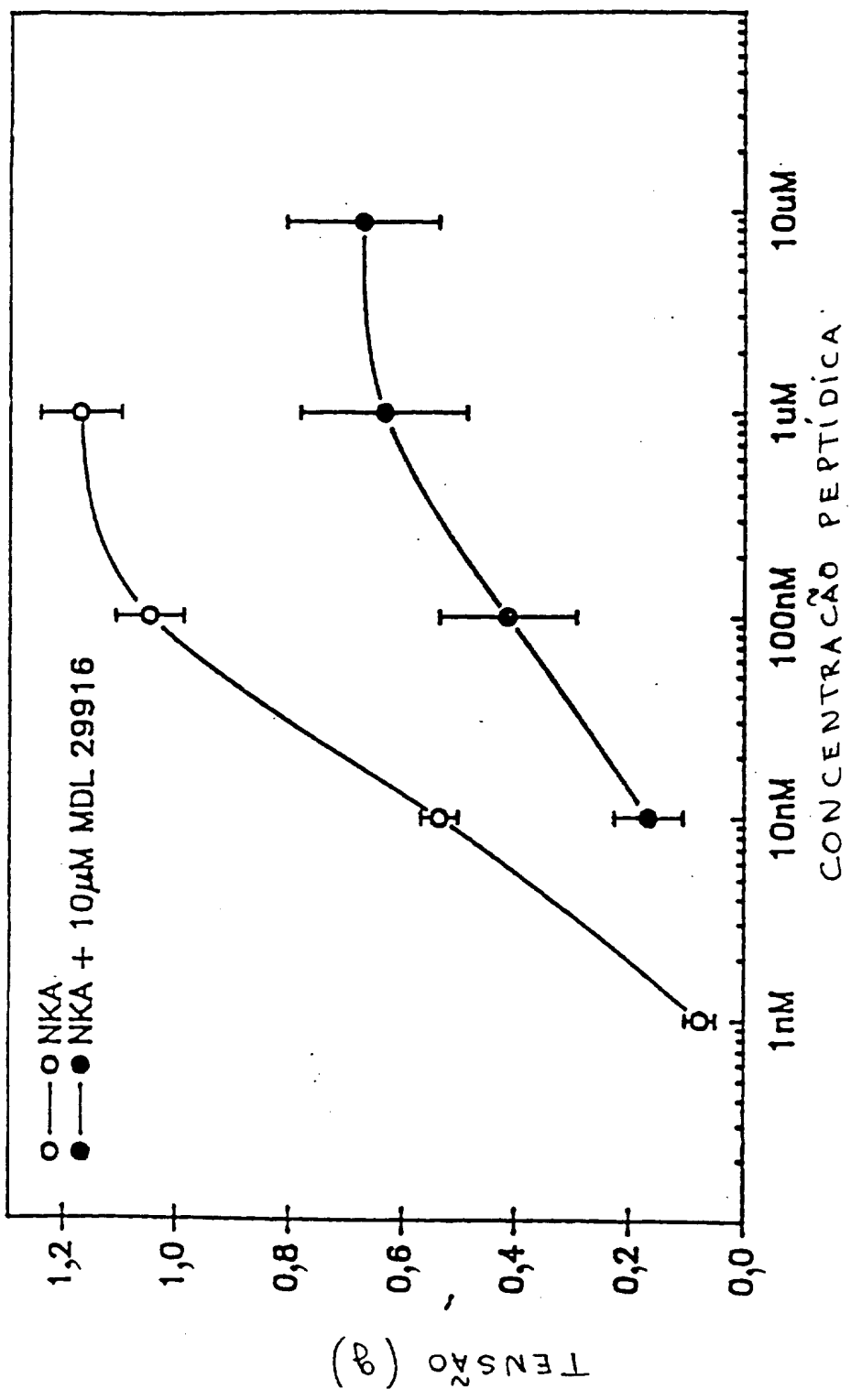


CONCENTRAÇÃO PEPTÍDICA

ANTAGONISMO DE NKA POR HDL 28564 NA BEXIGA DE MURGANHO.
10 μ M DE HDL 28564 PRODUZIRAM UMA VARIAÇÃO EM DIRECÇÃO À
DIREITA SIGNIFICATIVA NA CURVA DOSE - RESPOSTA DE CONTRACÇÃO DE
NKA. NKA MÁXIMO TAMBÉM SE APRESENTA DEPRIMIDO. Os VALORES REPRESENTAM
A MÉDIA $\pm$ E.P.M. DE EXPERIÊNCIAS EM TRIPLICADO.

FIGURA 4

EFEITO DE MDL 29916 NA ACTIVIDADE CONTRÁCTIL INDUZIDA POR
NKA NAS PREPARAÇÕES DE BEXIGA DE MURGANHO
($\bar{n}=3$)



ANTAGONISMO DE NKA POR MDL 29916 NA BEXIGA DE MURGANHO.
10 µM DE HDL 29916 PRODUZIRAM UMA VARIAÇÃO PARA A DIREITA
SIGNIFICATIVA NA CURVA DOSE - RESPOSTA DE CONTRACÇÃO DE NKA.
O MÁXIMO DE NKA, TAMBÉM SE APRESENTA DEPRIMIDO. OS VALORES
REPRESENTAM A MÉDIA ± E.P.H. DE EXPERIÊNCIAS EM TRIPLICADO.

FIGURA 5

2