



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 95112 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07K005/08 A

A61K038/06 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1990.08.28	(73) <i>Titular(es):</i> SPA SOCIETÀ PRODOTTI ANTIBIOTICI S.P.A. VIA BIELLA, 8 20143 MILAN IT
(30) <i>Prioridade:</i> 1989.08.28 IT 21567	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1991.04.18	(72) <i>Inventor(es):</i> TIBERTO BRUZZESE IT MASSIMO SIGNORINI IT ALBERTO CARLO FANCIANO IT ROBERTA TERMINI IT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 01/97 1997.01.27	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PÉPTIDO FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS

(57) *Resumo:*

PÉPTIDOS; DERIVADOS; ANALGÉSICOS; ANTIVIRAL;
IMUNO-MODULADORES

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 95 112

NOME: SPA SOCIETA' PRODOTTI ANTIOBIOTICI S.p.A., italiana,
com sede em Via Biella, 8, 20143 Milan, Itália.

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PÉ-
PTIDO FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS"

INVENTORES: Tiberto Bruzzese, Massimo Signorini, Alberto
Carlo Fanciano e Roberta Termini, residentes
na Itália.

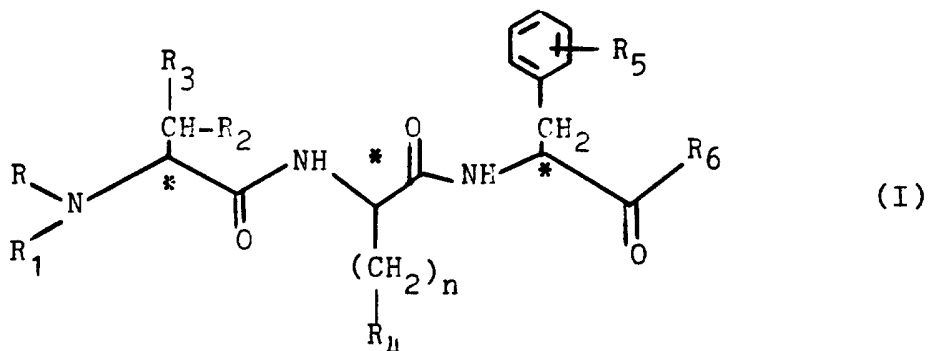
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo
4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
Itália - em 28 de Agosto de 1989, sob o nº. 21567 A/89.

~~CONFIDENTIAL~~

Descrição referente à patente de invenção de SPA SOCIETA' PRODOTTI ANTIOBIOTICI S.p.A., italiana, industrial e comercial, com sede em Via Biella, 8, 20143 Milan, Itália, (inventores: Tiberto Bruzzese, Massimo Signorini, Alberto Carlo Fanciano e Roberta Termini, residentes na Itália), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PÉPTIDO FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVOS".

Descrição

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de novos derivados de péptido com a fórmula geral (I) seguinte, que possuem propriedades analgésicas, antivirais, imuno-moduladoras farmacológicas, e dos seus sais formados no grupo amino ou carboxílico, desde que estes grupos sejam livres:



na qual os substituintes têm as seguintes significações:

R = -H, alquilo C₁-C₃, acilo C₁-C₃, alcóxicarbonilo com alquilo C₁-C₄;

$R_1 = -H$, alquilo C_1-C_3 ;

$R_2 = -H, -OH, -OR'_2$, em que $R'_2 =$ alquilo C_1-C_3 , acilo C_1-C_3 , benzilo (Bzl);

$R_3 = -H, -CH_3$;

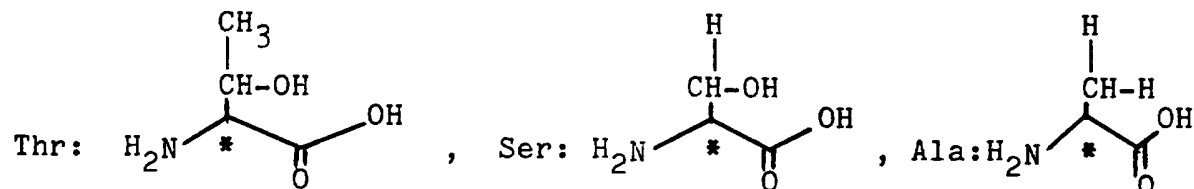
$n = 1, 2$;

$R_4 = -H, -COOH, -CONH_2, -COOR'_4$, em que $R'_4 =$ alquilo C_1-C_3 , benzilo;

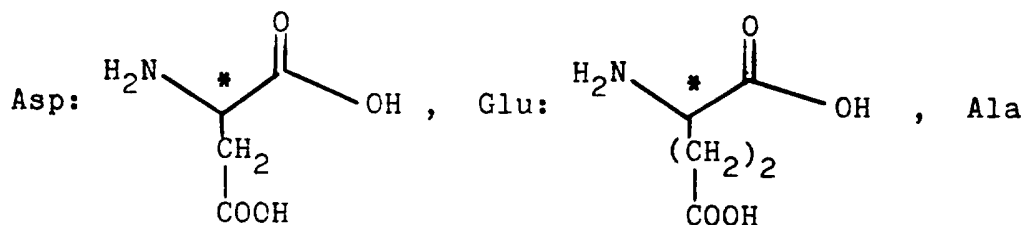
$R_5 = -H, 4-OH, 3,4-OH, -OH'_5$ em que $R'_5 =$ alquilo C_1-C_3 , acilo C_1-C_3 , benzilo;

$R_6 = -OH, -NH_2, -OR'_6$ em que $R'_6 =$ alquilo C_1-C_3 , benzilo.

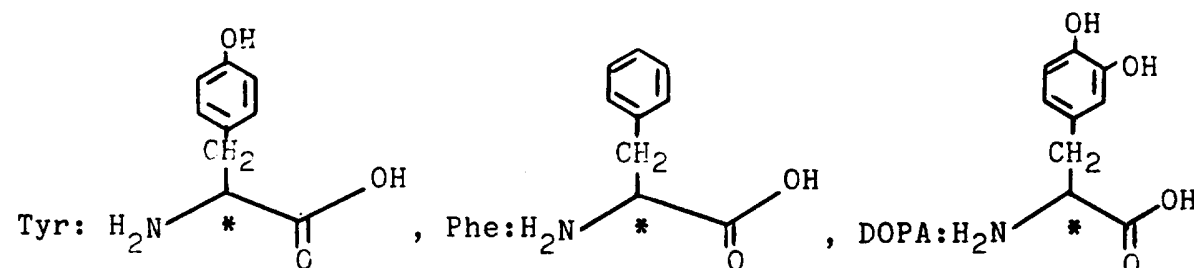
Assim na cadeia de péptido dos derivados com a fórmula (I), o aminoácido N-terminal é:



O aminoácido central é:



O aminoácido carboxi-terminal é:



Também incluídos estão os grupos hidroxí na cadeia lateral de Ser, Thr, Tyr e DOPA, e os grupos carboxi na cadeia

lateral de Asp e Glu que são modificados para darem os derivados de éter ou de éster e os derivados de éster ou de amida primária, respectivamente, de acordo com as significações anteriores dos vários substituintes, bem como dos derivados em que o grupo amino terminal é substituído com grupos alquilo, acilo ou alcóxicarbonilo.

O processo da invenção refere-se não apenas à preparação de péptidos com a fórmula (I) constituídos por amino ácidos com a configuração-L "natural", mas também de péptidos em que um, dois ou todos os aminoácidos com a configuração-D "não natural", ou são totalmente ou parcialmente racêmicos. Assim todos os diastereosómeros e racematos possíveis estão incluídos desde que quando ocorram simultaneamente as condições $R = -H$, $R_1 = -H$, $R_2 = -OH$, $R_3 = -CH_3$, $n = 1$, $R_4 = -COOH$, $R_5 = 4-OH$ e $R_6 = -OH$, pelo menos um dos átomos de carbono quirais representado com um asterisco na fórmula (I) tenha a configuração-D ou seja totalmente ou parcialmente racémico. A Patente Italiana 1 190 433 (apresentada em 11 de Dezembro de 1985, e atribuída em 16 de Fevereiro de 1988) em nome da Requerente, correspondente à Patente U.S. 4 784 988 (apresentada em 12 de Dezembro de 1986, e atribuída em 15 de Novembro de 1988), reivindica o composto H-Thr-Asp-Tyr-OH incluído na fórmula geral (I) em que $R = -H$, $R_1 = -H$, $R_2 = -OH$, $R_3 = -CH_3$, $n = 1$, $R_4 = -COOH$, $R_5 = 4-OH$, $R_6 = -OH$, mas o referido composto tem todos os três aminoácidos na configuração-L. Assim todos os derivados de péptido são compostos novos.

Quando o átomo de azoto do grupo amino terminal é básico (R e $R_1 = -H$, alquilo), os sais obtidos com ácidos farmacologicamente aceitáveis, quer inorgânicos como por exemplo HCl, HBr, H_2SO_4 , H_3PO_4 , etc. quer ácidos orgânicos como por exemplo ácido acético, malónico, málico, succínico, maleico, fumárico, cítrico, tartárico, benzóico etc. e com aminoácidos "ácidos" como por exemplo Asp e Glu, são também compostos novos que devem ser considerados como englobados pela fórmula geral (I).

Quando $R_3 = -COOH$ e $R_5 = -OH$, os sais de um ou de outro ou de ambos obtidos com bases farmacologicamente aceitáveis,

quer inorgânicos como por exemplo hidróxido de sódio, de potássio, de amônio, de cálcio, de magnésio, de alumínio, de ferro, etc., e orgânicos tal como por exemplo, mono-, di-, ou trialkilaminas, N-alkiletanolaminas, piperidina, piperazina, N-metilglucamina, trometamina, etc., e com aminoácidos "básicos" como, por exemplo, Lys e Arg, são também compostos novos que devem ser considerados como incluídos na fórmula geral (I).

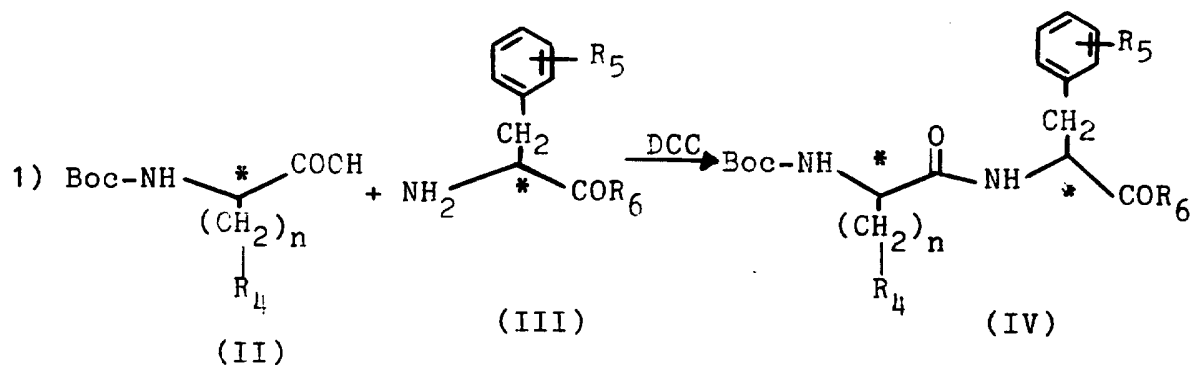
O processo de acordo com a invenção é caracterizado por os três aminoácidos ou os seus derivados que formam os derivados de péptido serem condensados em série e se necessário serem salificados os derivados de péptido.

A preparação dos derivados de péptido (I) pode ser efectuada em fase líquida ou sólida. De acordo com o processo da fase líquida, os três aminoácidos são condensados em série num solvente adequado como por exemplo DMF (N,N-dimetilformamida), THF (tetrahidrofurano) ou solventes clorados, com a formação posterior das duas ligações de péptido. A cadeia é formada a partir do terminal-N ou, preferivelmente, o aminoácido com o terminal em carboxi, em que o grupo carboxi é adequadamente protegido, por exemplo, como éster. Os grupos amino que não devem ser envolvidos nas duas fases de condensação posterior, são protegidos por grupos protectores tais como, por exemplo, t-butiloxicarbonilo (Boc), benziloxicarbonilo (Z), fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc), trifenilmetilo, tosilo, formilo, ftaloli-lo, etc. Os grupos protectores são em seguida removidos selectivamente na altura adequada da síntese, de acordo com os processos específicos para os diferentes grupos que são bem conhecidos. Para evitar reacções laterais indesejáveis, quando os compostos com a fórmula geral (I) têm grupos -OH e/ou -COOH livres, esses grupos são preferivelmente protegidos nos respectivos aminoácidos de partida protegendo os grupos que são em seguida removidos no final da formação da cadeia de péptido. Os grupos hidroxí são preferivelmente protegidos por esterificação ou por eterificação (particularmente a eterificação com benzilo), os grupos carboxi por esterificação com álcoois (particularmente o álcool benzílico). Se os produtos finais com a fórmula geral (I) tiverem grupos hidroxí e/ou carboxi substituídos

os substituintes respectivos são preferivelmente inseridos nos aminoácidos correspondentes antes da formação da cadeia de péptido, de modo a que não sejam necessários grupos protectores. Contudo podem também ser efectuadas reacções de substituição nos grupos hidroxí ou carboxi livres do produto final (I).

A formação da ligação de péptido ocorre de acordo com processos conhecidos tais como, por exemplo, por reacção do grupo amino com um anidrido misto, que é preparado localmente utilizando um clorocarbonato de alquilo (por exemplo de etilo ou de isobutilo), ou fazendo reagir o grupo amino com um derivado activo do carboxilo tal como, por exemplo, um cloreto de acilo, um éster de N-hidroxisuccinimida um éster de mono- ou di-nitrofenilo ou um éster de penta-halofenilo, ou com um imidazolido preparado a partir do carbonildiimidazole. Outro processo vantajoso consiste na formação directa da ligação de péptido entre o grupo amino e o grupo carboxi por meio de uma carbodiimida, como por exemplo, dicitclohexilcarbodiimida, com ou sem a utilização simultânea de adjuvantes como por exemplo N-hidroxibenzotriazole (HOBT) ou dimetilaminopiridina (DMAP). As reacções são efectuadas em solventes do tipo THF, DMF ou clorados, a temperaturas que variam de -20°C a $+60^{\circ}\text{C}$, preferivelmente entre $+4^{\circ}\text{C}$ e 30°C .

Um modo particularmente vantajoso para efectuar a síntese dos derivados de péptido (I), em que os grupos hidroxí e carboxi são livres, e o grupo amino é primário, é a que é ilustrada pelo seguinte esquema:



vres (fase 4) é feita através da hidrogenação catalítica posterior com 10% de Pd em carvão em solução aquosa de ácido acético (transformação dos éteres de benzilo e dos ésteres de benzilo presentes nos grupos hidroxil e carboxil livres) e tratamento com 50% de TFA em cloreto de metileno durante cerca de 1 hora (desprotecção de N-Boc). A sequência de acordo com a qual são efectuadas as duas desprotecções não é importante para o rendimento e pureza do produto final (I). Alternativamente, a transformação de (VII) para (I) é efectuada numa única fase por tratamento de (VII) com HBr 2-4N gasoso em ácido acético glacial durante 15-180 minutos a uma temperatura de 0-80°C (preferivelmente HBr 2 N durante 30 minutos a 20°C). Por desprotenação com uma base (por exemplo trietilamina), os derivados (I) possuindo um grupo amino terminal livre, são finalmente obtidos sob a forma de pós brancos. Os derivados (I) em que R=acilo são preparados por N-Boc-desprotecção dos derivados (VII) com 50% de TFA em cloreto de metileno, e acilando o -NH₂ livre obtido por um dos processos conhecidos de acilação, e efectuando finalmente uma desbenzilação catalítica com hidrogénio e Pd/C.

Alternativamente, os péptidos (I) da invenção são preparados por meio de sequência da reacção em fase sólida (processo de Merrifield). Uma via típica para a síntese implica a esterificação de um copolímero de estireno-divinilbenzeno clorometilado (resina de Merrifield, 1% reticulada) com o aminoácido com terminal em carboxil possuindo o grupo amino (como por exemplo Boc) e, se presente, os grupos hidroxil fenólicos da cadeia lateral (como por exemplo ésteres de benzilo) adequadamente protegidos. Após se isolar o composto de aminoácido protegido com Boc-resina e se determinar o grau de esterificação (mmol de aminoácido/g de resina), o grupo N-protegido é removido de acordo com processos conhecidos, como por exemplo por reacção com o ácido trifluoroacético. Após tratamento com trietilamina, as condensações do aminoácido com o terminal em N, sendo ambos N-Boc-protegidos e possuindo os grupos carboxil e hidroxil (quando presentes na cadeia lateral) protegidos sob a forma de ésteres de benzilo e ésteres de benzilo, respectivamente, são efectuadas em sequência de acordo com o mesmo proce-

~~CONFIDENTIAL~~

dimento (condensação com DCC). O composto de tripéptido O-benzil-protégido N-Boc-resina é obtido desta forma. A clivagem da resina e as N,O-desprotecções são efectuadas de acordo com processos conhecidos como por exemplo tratamento com HBr gasoso em TFA na presença de anisole, ou com HF seco líquido. Após a desprotonação do grupo amino por meio de uma base e isolamento e purificação adequados, o produto com a fórmula (I) é obtido sob a forma de um pó branco. Os substituintes opcionais os grupos amino e/ou hidroxí e carboxi são inseridos, de acordo com a fórmula geral (I), nos aminoácidos importantes antes das reacções de condensação de péptido, e nalguns casos, eles são inseridos no final quando a cadeia de péptido já foi formada.

A partir dos produtos com a fórmula (I) da invenção os sais nos grupos amino (quando R e R₁ = -H, alquilo) ou os grupos carboxi (quando está livre) são preparados por tratamento com quantidades equivalentes de ácidos ou, respectivamente, bases em solução aquosa ou orgânica. Os sais são obtidos a partir das suas soluções por concentração e/ou arrefecimento, evaporação até à secura, liofilização secagem por atomização, por precipitação com solventes, etc.

Tendo em vista as propriedades analgésicas e também antivirais e imunológicas, os compostos (I) são adequados para utilização terapêutica, quer humana quer veterinária. Na terapia humana, é administrada uma dosagem de 100 a 1000 mg/dia, preferivelmente de 200 a 600 mg/dia, numa única dose ou numa dose subdividida durante 24 horas.

Os compostos (I) são formulados em diferentes composições farmacêuticas conhecidas tais como, por exemplo, cápsulas de gelatina macias ou duras, comprimidos, pílulas revestidas com açúcar, cápsulas ou comprimidos de libertação sustida, envelopes ou ampolas de monodose oral, grânulos de xarope instantâneo, xaropes, soluções para injeccção, pós liofilizados para injeccções, supositórios, cremes, etc. Dependendo das diferentes composições, juntamente com o ingrediente activo adequado são utilizados adjuvantes adequados como por exemplo excipientes, estabilizantes, solventes, corantes, aromatizantes, a-

gentes edulcorantes, etc. como é geralmente utilizado na tecnologia farmacêutica.

Os seguintes Exemplos ilustram mas não limitam de qualquer forma a invenção.

EXEMPLO 1

Síntese em fase líquida de H-Thr-Asp-D-Tyr-OH

A) Foram dissolvidos 14 g de H-D-Tyr(Bzl)-OBzl (38,7 mmoles) e 12,53 g de Boc-Asp(OBzl)-OH (38,7 mmoles) em 145 ml de CH₂Cl₂. Na solução refrigerada foram deitados gota a gota 8,78 g de DCC (42,5 mmoles) dissolvidos em 35 ml de CH₂Cl₂. A mistura foi deixada em agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e durante uma noite a 4°C. O precipitado resultante (diciclohexilureia) é separado por filtração e o filtrado é evaporado até à secura em vazio. Retoma-se o resíduo semi-sólido com 170 ml de etanol/água 70/30, submete-se a mistura a refluxo formando-se duas fases imiscíveis e, deixa-se arrefecer com agitação vigorosa. Filtra-se o sólido branco resultante e trata-se de novo com etanol/água 70/30 sob refluxo. Obtêm-se assim 20 g de Boc-Asp(OBzl)-D-Tyr(Bzl)-OBzl.

p.f. = 67°C; $[\alpha]_D^{25} = +4.3^\circ$ (C=1, CH₂Cl₂)

B) Dissolvem-se 20 g do produto anterior (30 mmoles) em 60 ml de ácido trifluoroacético (TFA)/CH₂Cl₂ 1/1, e mantém-se em agitação durante 1 hora à temperatura ambiente. Evapora-se a solução em vazio e trata-se o resíduo oleoso seco com éter anidro obtendo-se assim um precipitado branco que é filtrado e lavado com éter anidro. Obtêm-se assim 18 g de TFA H-Asp-(OBzl)-D-Tyr)BzlO.

p.f. = 125-8°C; $[\alpha]_D^{25} = +1.6^\circ$ (C=1, THF)

C) Prepara-se uma suspensão de 17,45 g do produto anterior (25,6 mmoles) em 65 ml de cloreto de metileno, e adicionam-se 3,6 ml de trietilamina (25,6 mmoles). A solução transparente assim obtida é refrigerada com gelo e adicionada com 7,9 g de Boc-Thr(Bzl)-OH (25,6 mmoles) dissolvidos em 37 ml de clo-

reto de metileno seguidos de 5,81 g de DCC (28,2 mmoles) dissolvidos em 28 ml de cloreto de metileno e adicionados gota a gota lentamente. Mantem-se a mistura sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e durante uma noite a 4°C. O precipitado branco de diciclohexilureia é separado por filtração, e o filtrado é evaporado à secura em vazio. O resíduo oleoso espesso é purificado por refluxo com 100 ml de etanol/água 70/30 e arrefecendo lentamente a mistura das duas fases líquidas não miscíveis assim obtidas com agitação vigorosa. Após um segundo tratamento semelhante, obtêm-se sob a forma de um pó branco 20 g de Boc-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-D-Tyr(Bzl)-OBzl (23,3 mmoles). Produto com a fórmula (I), em que R = Boc, R₁ = -H, R₂ = -OBzl, R₃ = -CH₃, n = 1, R₄ = -COOBzl, R₅ = 4-OBzl, R₆ = -OBzl p.f. = 80°C; $[\alpha]_D^{25} = +2^\circ$ (C=1, CH₂Cl₂).

D) Efectua-se a diluição de 20 g do produto anterior (23,3 mmoles) em 150 ml de ácido acético a 80%, adicionam-se 5 g de catalisador de 10% de Pd em carvão e hidrogena-se a mistura à temperatura e pressão ambientes durante um período de 22 horas. Separa-se o catalisador por filtração e evapora-se o solvente em vazio. O resíduo sólido (11 g) é Boc-Thr-Asp-D-Tyr-OH (fórmula (I), em que R = Boc, R₁ = H, R₂ = -OH, R₃ = -CH₃, n = 1, R₄ = -COOH, R₅ = -4-OH, R₆ = -OH). Dissolve-se este produto tal e qual 100 ml de TFA/cloreto de metileno 1/1 e mantém-se à temperatura ambiente durante 90 minutos. Após evaporação à secura, retoma-se o resíduo semi-sólido com 80 ml de éter etílico, e filtra-se o sólido resultante obtendo-se 10 g de TFA H-Thr-Asp-D-Tyr-OH. p.f. = 110°C, $[\alpha]_D^{25} = -29,5$ (C=1, THF).

E) Dissolvem-se 10 g do produto anterior (19,6 mmoles em 50 ml de etanol absoluto. Arrefece-se a solução num banho de gelo, e adicionam-se lentamente gota a gota 2,84 ml de trietilamina (20 mmoles) em 10 ml de etanol com agitação. Forma-se rapidamente um precipitado branco fino, que é filtrado e é levado a suspensão duas vezes com 30 ml de etanol frio. Após secagem em vazio a 40°C, obtêm-se 7 g de H-Thr-Asp-D-Tyr-OH (17,6 mmoles).

(Produto com a fórmula (I) em que R = -H, R₁ = -OH, R₃ = -CH₃, n = 1, R₄ = -COOH, P₅ = 4-OH, R₆ = -OH). p.f. = 138°C; $[\alpha]_D^{25} = -25,7^\circ$ (C=1, H₂O); Rf = 0,41 (placas de gel de sílica F₂₅₄. Eluente: CH₃OH/CH₃Cl/NH₄OH conc. 40/40/14. Detecção: UV 254 nm, ou pulverização com ninhidrina. Análise do aminoácido DereThe confirma a estrutura do produto.

EXEMPLO 2

De acordo com o processo referido no Exemplo 1, condensando o composto H-Tyr(Bzl)-OBzl, Boc-Asp(OBzl)-OH e Boc-Thr(Bzl)-OH possuindo uma quiralidade L, D ou DL, preparam-se os seguintes tripeptidos:

- H-Thr-D-Asp-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = +34,5^\circ$ (C=1, H₂O) P.F. 160°C Rf = 0,44 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-D-Thr-Asp-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = -1,25^\circ$ (C=1, H₂O) P.F. 149°C Rf=0,5 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-D-Thr-D-Asp-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = +19,6^\circ$ (C=1, H₂O) P.F. 95°C Rf=0,42 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-Thr-D-Asp-D-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = +8$ (C=1, H₂O) P.F. = 120°C Rf=0,41 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-D-Thr-Asp-D-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = -23,2$ (C=1, H₂O) P.F. 140°C Rf=0,39 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-D-Thr-D-Asp-D-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = -8,2^\circ$ (C=1, H₂O) P.F. = 148°C Rf=0,40 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-DL-Thr-Asp-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = +3$ (C=1, H₂O) P.F. = 135°C Rf=0,40 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)
- H-Thr-Asp-D,L-Tyr-OH $[\alpha]_D^{25} = +12,5$ (C=1, H₂O) P.F. = 193-5°C Rf=0,34 (CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH conc. 40/40/14)

EXEMPLO 3

Síntese em fase líquida de Ac-Thr-Asp-Tyr-OH

São dissolvidos 4 g de Boc-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)Tyr(Bzl)-OBzl (84,6 mmoles), preparado a partir de H-Tyr(Bzl)-OBzl, Boc-Asp(OBzl)-OH e Boc-Thr(Bzl)-OH de acordo com o processo referido no Exemplo 1, A)-C), em 40 ml de tetrahidrofurano/cloreto de metileno 1/1 e mantem-se sob agitação à temperatura ambiente durante 1 hora. Evapora-se o solvente em vazio e retoma-se o resíduo oleoso espesso com éter etílico, obtendo-se um sólido branco que é filtrado e seco em vazio. Os 3,5 g assim obtidos de TFA·H-Thr-(Bzl)-Asp(OBzl)-Tyr(Bzl)-OBzl- (4,01 mmoles) são suspensos em 30 ml de cloreto de metileno e são tratados com 0,56 ml de trietilamina (4,01 mmoles) dissolvidos em 5 ml de cloreto de metileno. Arrefece-se a solução resultante em gelo e adiciona-se a 0,277 g de ácido acético (4,6 mmoles). Finalmente adiciona-se lentamente gota a gota uma solução de 0,91 g de DCC (4,4 mmoles) em 10 ml de cloreto de metileno com agitação.

Mantem-se a mistura à temperatura ambiente durante 24 horas e à temperatura de refluxo durante 2 horas.

Arrefece-se a mistura, separa-se por filtração a diciclohexilureia resultante e evapora-se o filtrado à secura em vazio. O resíduo semi-sólido (3,8 g) é dissolvido em ácido acético a 80 % e é hidrogenado durante 16 horas à temperatura e pressão ambientes na presença de 0,95 g de 10% de Pd em carvão. Separa-se o catalisador por filtração, evapora-se o filtrado à secura em vazio e retoma-se com 30 ml de éter etílico, dando-se a formação rápida de um sólido branco que é filtrado e lavado várias vezes com éter. Após secagem, obtêm-se, 1,6 g de Ac-Thr-Asp-Tyr-OH (3,6 mmoles). (Produto com a fórmula (I), em que $R = -COCH_3$, $R_1 = -H$, $R_2 = -OH$, $R_3 = -CH_3$, $n = 1$, $R_4 = -COOH$, $R_5 = 4-OH$, $R_6 = -OH$). p.f. = $66-7^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{25} = -19,9$ ($C = 1, H_2O$).

EXEMPLO 4

Síntese em fase sólida de H-Thr-Asp-D-Tyr-OH

A) São esterificados 7,5 g de um copolímero de estireno-divinilbenzeno clorometilado (resina de Merrifield, 1% reticulada) com 1,113 g de Boc-D-Tyr(Bzl)-OH (3 mmoles) por refluxo durante 45 horas em 60 ml de acetato de etilo na presença de 0,42 ml de trietilamina. Separa-se a resina por filtração, lava-se sucessivamente com acetato de etilo, etanol e água, e seca-se em vazio a 25°C. Obtêm-se 8,09 g de Boc-D-Tyr(Bzl)-resina com um grau de esterificação de 0,201 mmoles de D-Tyr/g calculado na base da diferença entre a quantidade total do derivado de D-Tyr utilizado e o que permanece nas águas-mães e nas lavagens (determinação por UV a 276 nm). A resina é Boc-desprotegida por tratamento com 70 ml de tetrahydrofurano/cloreto de metileno 1/1 durante 30 minutos à temperatura ambiente; e em seguida é filtrado e suspenso durante 30 minutos com agitação em 70 ml de 10% de trietilamina em clorofórmio. Após filtração, lavagem com clorofórmio e secagem em vazio, obtém-se o produto que é H-D-Tyr(Bzl)-resina.

B) O produto obtido na fase anterior é suspenso em 190 ml de cloreto de metileno e tratado com 1,575 g de Boc-Asp(OBzl)-OH (4,86 mmoles), três vezes a quantidade estequiométrica). Após uma curta agitação, adicionam-se 1,005 g de DCC (4,867 mmoles) dissolvidos em 40 ml de cloreto de metileno e deixa-se a reação prosseguir durante 12 horas à temperatura ambiente com agitação. No final, filtra-se a resina, lava-se com cloreto de metileno e metanol e seca-se. Após se confirmar o fim da reação através da reação de ninhidrina (não aparecimento de cor devido aos grupos amino não reagidos), a resina é Boc-desprotegida (tetrahydrofurano) e tratada com Et₃N como descrito em A), obtendo-se o produto Boc-Asp(OBzl)-D-Tyr(Bzl)-resina.

C) Faz-se reagir o produto obtido na fase anterior com Boc-Thr-(Bzl)-OH e DCC com cloreto de metileno de acordo

com o mesmo processo descrito em B), Após filtração, lavagem com cloreto de metileno e metanol e secagem, obtem-se o produto Boc-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-D-Tyr-(Bzl)-resina.

D) A clivagem da cadeia de péptido da resina e a desprotecção simultânea dos grupos amino, carboxi e hidroxí protegidos são efectuadas suspendendo a resina obtida na fase anterior em 120 ml de tetrahidrofurano contendo 6 ml de anisole, arrefecendo a suspensão com agitação a 10-15°C, e fazendo borbulhar nela HBr gasoso à mesma temperatura durante 80 minutos. No final a resina gasta é separada por filtração e lavada com tetrahidrofurano. O filtrado e lavagens combinados são evaporados à secura em vazio. Em seguida são obtidos 0,766 g de tripéptido desprotegido sob a forma de trifluoroacetato (1,5 mmoles) que são dissolvidos em 35 ml de etanol/acetato de etilo 1/1 e adicionados com 0,22 ml de Et₃N (1,6 mmoles). Por arrefecimento a 0°C precipita um pó branco da solução, que é em seguida filtrado, lavado com etanol e seco. Obtêm-se assim 0,556 g (1,4 mmoles) de H-Thr-Asp-D-Tyr-OH. A análise de aminoácidos e as propriedades físicoquímicas (p.f. $[\alpha]_D^{25}$, Rf) confirmam a identidade deste produto com H-Thr-Asp-D-Tyr-OH preparado por síntese em fase líquida (ver Exemplo 1).

EXEMPLO 5

De acordo com o método da síntese de péptidos em fase líquida que se referiu no Exemplo 1, os compostos trioéptidos são preparados por condensação sequencial (por meio de DCC) dos derivados adequadamente protegidos dos três aminoácidos entre os quais os que possuem um grupo terminal carboxi é Tyr ou Phe, a parte central é Asp, Glu ou Ala, e o N-terminal é Ser, Thr ou Ala. Os aminoácidos com grupo terminal carboxi têm o grupo carboxi protegido sob a forma de um éster de benzilo, a parte central do aminoácido é N-Boc-protegido, e a Boc-protecção é selectivamente removida com tetrahidrofurano antes da condensação com aminoácido N-terminal isto é também N-Boc-protegido. Os grupos hidroxí possivelmente presentes nas cadeias laterais são protegidos como éteres de benzilo, e os grupos carboxi nas ca-

deias laterais são protegidos como ésteres de benzilo. As desprotecções finais que produzem o tripéptido livre são efectua-
das de acordo com os métodos do Exemplo 1. Os derivados de ami-
noácido protegidos de partida são produtos comerciais que são
sintetizados de acordo com os processos conhecidos na técnica.
Por esta forma são preparados os seguintes tripéptidos:

H-Ser-Asp-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-H$, $n=1$,
 $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$
PF = $174-8^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{25} = +6,7^{\circ}$; Rf = 0,33

H-Thr-Glu-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=2$,
 $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$
PF = $107-10^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{25} = +5,5^{\circ}$; Rf = 0,31

H-Ala-Asp-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=R_3=-H$, $n=1$,
 $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$
PF = $169-73^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{25} = +4,6^{\circ}$; Rf = 0,35

H-Thr-Ala-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=1$,
 $R_4=-H$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$
PF = $145-9^{\circ}C$, $[\alpha]_D^{25} = +3,3^{\circ}$; Rf = 0,36

H-Thr-Asp-Phe-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=1$,
 $R_4=-COOH$, $R_5=-H$, $R_6=OH$
PF = $188-90^{\circ}C$ (dec.) ; $[\alpha]_D^{25} = +7,8$; Rf = 0,38

Os valores de $[\alpha]_D^{25}$ são determinados em solução aquo-
sa; os valores de Rf são determinados por TLC (cromatografia de
camada fina) em gel de sílica eluindo com metanol/cloreto de
metileno/amónia concentrada 40/40/14 e detetando as manchas com
luz ultra violeta (254 nm) ou pulverizando com ninhidrina (côr

amarela).

EXEMPLO 6

De acordo com os métodos referidos no Exemplo 5 e partindo de H-Tyr(Bzl)-OBzl, Boc-DL-Glu(OBzl)-OH e Boc-Thr(Bzl)-OH, prepara-se o tripéptido H-Thr-DL-Glu-Tyr-OH.

EXEMPLO 7

De acordo com um método referido no Exemplo 5, prepara-se o H-Thr-Asp-DOPA por condensação sequencial dos aminoácidos importantes adequadamente protegidos. Devido à fácil oxidabilidade de DOPA e dos seus derivados, todas as fases de preparação são efectuadas numa atmosfera inerte. São condensadas quantidades equimolares de Boc-Asp(OBzl)-OH e éster metílico de 3,4-diacetoxifenilalanina (preparado de acordo com J. Med. Chem., 20, 1435, 1977) por DCC em cloreto de metileno. O dipéptido protegido assim obtido é N-Boc-desprotegido (tetrahydrofurano/cloreto de metileno 1/1) e condensado (DCC) com uma quantidade equimolar de Boc-Thr(Bzl)-OH. O tripéptido protegido assim obtido é cataliticamente hidrogenado (10% de Pd/C em solução aquosa de 50% de ácido acético). As condições de operação produzem, para além da clivagem dos grupos protectores de benzilo, a hidrólise dos grupos de éter de acetilo e de metilo em DOPA. Assim o Boc-Thr-Asp-DOPA é obtido e dá o cloridrato de H-Thr-Asp-DOPA por desprotecção com tetrahydrofurano/cloreto de metileno, evaporação à secura e evaporações repetidas à secura com metanol contendo HCl gasoso (Produto com a fórmula (I) com $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=1$, $R_4=-COCH$, $R_5=-3,4-OH$, $R_6=-OH$). $[\alpha]_D^{25} = +5.3$ (C=1, CH₃OH); p.f. = 106-8°C; Rf = 0.37 (CH₂Cl₂/CH₃OH 1/1).

EXEMPLO 8

De acordo com os processos referidos no Exemplo 5 e partindo dos aminoácidos em que os grupos carboxi e amino foram modificados no início, são preparados os seguintes derivados com a fórmula (I), contendo grupos carboxi e amino correspon-

dentemente modificados.

H-Thr-Asp (OMe)-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=1$,
 $R_4=-COOCH_3$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$)

PF = $100-5^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{25} = +4,4$ Rf = 0,58

H-Thr-Asp-Tyr-OMe

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-H$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$, $n=1$,
 $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OCH_3$)

PF = $100-3^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{25} = +14,6$ Rf = 0,66

Boc-Thr-Asp-Tyr-OH

Produto com a fórmula (I) em que $R=-H$, $R_1=t Bu OCO-$, $R_2=-OH$,
 $R_3=-CH_3$, $n=1$, $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$)

PF = $185-90^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{25} = +24,9$ Rf = 0,55

Me₂-Thr-Asp-Tyr-OH · CH₃COOH

Produto com a fórmula (I) em que $R=R_1=-CH_3$, $R_2=-OH$, $R_3=-CH_3$,
 $n=1$, $R_4=-COOH$, $R_5=4-OH$, $R_6=-OH$)

PF = $157-60^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{25} = +9,97$ Rf = 0,51

os poderes rotativos são determinados em solução aquosa (C = 1), e TLC são efectuados em placas de gel de sílica eluindo com clorofórmio/metanol/amónia concentrada 40/40/14. As manchas foram detectadas com luz UV (254 nm) ou, para os compostos que possuem grupos amino primários e carboxi livres por pulverização com ninhidrina (cor amarela).

De modo semelhante, preparam-se H-Thr-Asp(OMe)-Tyr-OMe, H-Thr-Asp-Tyr-NH₂, H-Thr-Asp-Tyr(Me)-OH .

EXEMPLO 9

Síntese de H-Thr-Asp(OMe)-D-Tyr-OMe

O H-Thr-Asp-D-Tyr-OH preparado de acordo com o processo referido no Exemplo 1 é dissolvido em 15 volumes de sul-

~~CONFIDENTIAL~~

fóxido de dimetilo, a solução é arrefecida para 0-5°C e é adicionada com um excesso de diazometano em solução etérea. A mistura reaccional é deixada durante 2 horas a 0-5°C e durante mais 2 horas à temperatura ambiente. Diluindo a solução com éter, precipita um sólido ligeiramente pastoso que é em seguida filtrado, agitado com uma pequena quantidade de éter durante meia hora, e filtrado de novo. Obtem-se assim o composto H-Thr-Asp(Ome)-D-Tyr-OMe sob a forma de um pó branco cristalino.

EXEMPLO 10

Cloridrato de H-Thr-Asp-D-Tyr-OH

Dissolve-se H-Thr-Asp-D-Tyr-OH em 5 volumes de água, adiciona-se a solução com um equivalente molar de HCl 1N. Por liofilização ou diluição com acetona da solução, obtem-se o cloridrato como um pó muito solúvel em água.

EXEMPLO 11

Sal de lisina de H-Thr-Asp-Tyr-OH

Dissolve-se o H-Thr-Asp-Tyr-OH em 5 volumes de água e dissolve-se uma quantidade equimolar de lisina nessa solução.

Concentra-se a solução para um pequeno volume em vazio e adiciona-se com acetona. Por meio de um curto arrefecimento precipita o sal de lisina como um pó facilmente solúvel em água.

EXEMPLO 12

Cápsulas de 100 mg e 200 mg para administração oral

	<u>Cáp. de 100 mg</u>	<u>Cáp. de 200 mg</u>
H-Thr-Asp-D-Tyr-OH	35.000 g	70.00 g
Estearato de magnésio	1.110 g	2.22 g
Celulose microcristalina	51.800 g	103.60 g

A mistura é subdividida em 350 cápsulas.

EXEMPLO 13

Pó liofilizado esterilizado para a preparação de soluções injectáveis de 100 mg e de 200 mg

	<u>100 mg f-d</u>	<u>200 mg f-d</u>
H-Thr-Asp-D-Tyr-OH	32.500 g	65.00 g
Cloreto de sódio	2.280 g	4.56 g
Água bidestilada até	650 ml	650.00 ml

Filtra-se a solução numa membrana esterilizante. Enchem-se com 325 ampolas com 2 ml cada uma de uma solução esterilizada e liofiliza-se em condições esterilizadas.

EXEMPLO 14

Supositórios de 200 mg

H-Thr-Asp-D-Tyr-OH	20 g
Esteres de glicérido de ácidos gordos	160 g

O ingrediente activo micronizado é disperso em massa para supositórios (ésteres de glicéridos de ácidos gordos) fundidos a 42°C. A suspensão homogénea é subdividida em 100 válvulas para supositórios e é arrefecida.

EXEMPLO 15

Creme a 5% para aplicação tópica

H-Thr-Asp-D-Tyr-OH	17.500 g
Agente emulsionante	14.000 g
Propileno glicol	42.000 g
Óleo mineral branco	28.000 g
Lanolina	35.000 g
Agente conservante (Paraben)	0.525 g
Ácido cítrico · H ₂ O	0.945 g
Citrato de sódio · 2H ₂ O	0.980 g
Água destilada	211.050 g

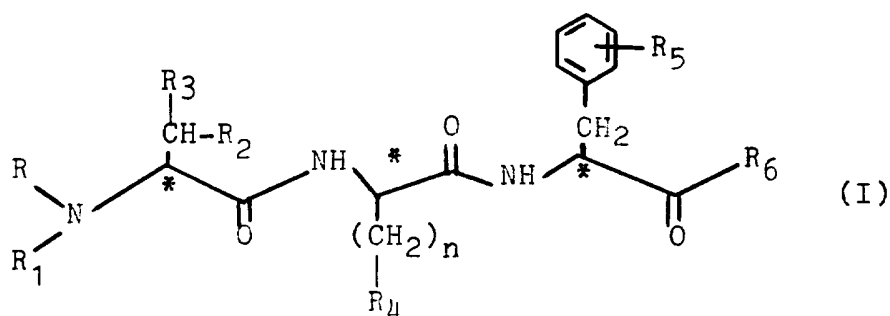
O creme obtido com os componentes acima mencionados é

embalado em tubos de 15 g.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

processo para a preparação de derivados de péptido com a fórmula geral (I), possuindo propriedades analgésicas, antivirais, farmacologicamente imuno-moduladoras, e dos seus sais formados no grupo amino ou carboxílico, desde que esses grupos sejam livres,



na qual os substituintes têm as seguintes significações:

R = -H, alquilo C₁-C₃, acilo C₁-C₃, alcóxicarbonilo com alquilo C₁-C₄;

R₁ = -H, alquilo C₁-C₃;

R₂ = -H, -OH, -OR'₂, em que R'₂ = alquilo C₁-C₃, acilo C₁-C₃,

R₃ = -H, -CH₃;

n = 1, 2;

R₄ = -H, -COOH, -CONH₂, -COOR'₄, em que R'₄ = alquilo C₁-C₃, benzilo;

R₅ = -H, 4-OH, 3,4-OH, -OR'₅ em que R'₅ = alquilo C₁-C₃, acilo C₁-C₃, benzilo;

R₆ = -OH, -NH₂, -OR'₆ em que R'₆ = alquilo C₁-C₃, benzilo.

e em que na cadeia de péptido dos derivados com a fórmula (I) o aminoácido no terminal -N é:

...-H, e H₂O, e os ácidos farmacologicamente aceitáveis, quer inorgânicos tais como, por exemplo, HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, etc., e orgânicos como por exemplo, ácido acético, malónico, fólico, succínico, málico, fumárico, cítrico, tartárico, benzoico, etc., e com aminoácidos "ácidos" como, por exemplo, Asp e Glu, e quando R₁=-COOH e R₂=-OH, os sais de um ou de outro ou de ambos obtidos com bases farmacologicamente aceitáveis, quer inorgânicos como por exemplo, hidróxido de sódio, potássio, amônio, cálcio, magnésio, alumínio, ferro, etc., e orgânicos como, por exemplo, mono-, di- ou triálquilaminas, N-álquiletanolaminas, piperidina, piperazina, N-metilglucerina, trometamina, etc., e com aminoácidos "básicos" como por exemplo Lys e Arg, caracterizado por os três aminoácidos ou seus derivados que formam os derivados de péptido serem condensados em série, e, se necessário, os derivados de péptido serem salificados.

- 2ª -

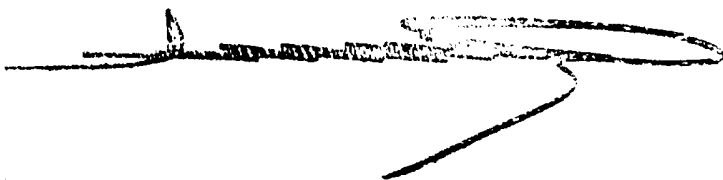
Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os três aminoácidos serem condensados em série num solvente adequado, com a formação subsequente das duas ligações de péptido, formando-se a cadeia a partir do terminal-N ou, preferivelmente, a partir do terminal de carboxi do aminoácido, sendo o grupo carboxi adequadamente protegido, sendo protegidos os grupos amino que não devem estar envolvidos pelas duas fases de condensação posteriores, por grupos protectores e serem em seguida selectivamente renovados os grupos protectores.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o solvente ser constituído por solventes clorados, N,N-dimetilformamida, tetrahydrofurano.

- 4ª -

3 -



Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se proteger o grupo carboxi do aminoácido com terminal de carboxi sob a forma de um éster.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se protegerem os grupos amino que não devem estar envolvidos nas duas fases de condensação posteriores por grupos ter-butiloxicarbonilo, benziloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, trifenilmetilo, tosilo, formilo, ftalosilo.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por, para se evitarem reacções laterais indesejadas, quando os compostos com a fórmula (I) têm grupos -OH e/ou -COOH livres, esses grupos serem protegidos nos respectivos aminoácidos de partida, sendo os grupos hidroxí preferivelmente protegidos por esterificação ou eterificação e os grupos carboxi por esterificação com álcool.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por, se os produtos finais com a fórmula geral (I) tiverem grupos hidroxí e/ou carboxi, os respectivos substituintes serem preferivelmente inseridos no aminoácido correspondente antes da formação da cadeia de péptido.

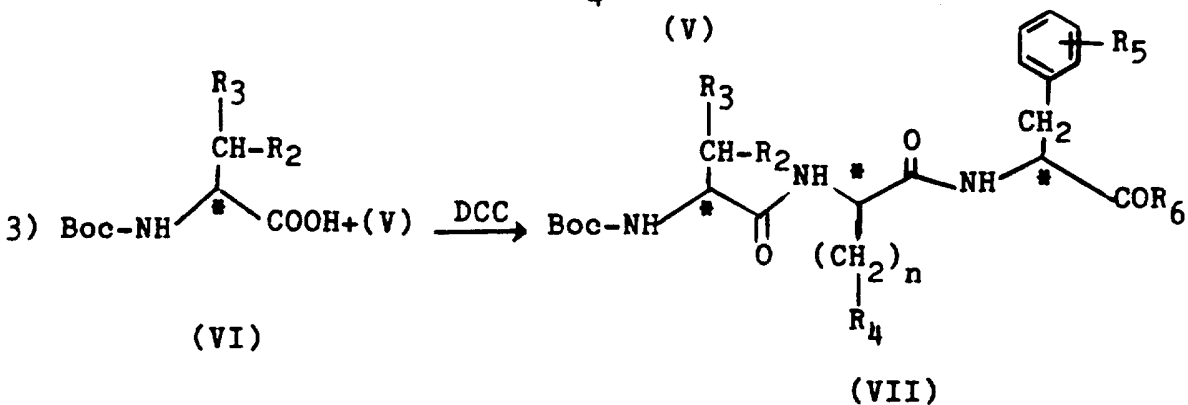
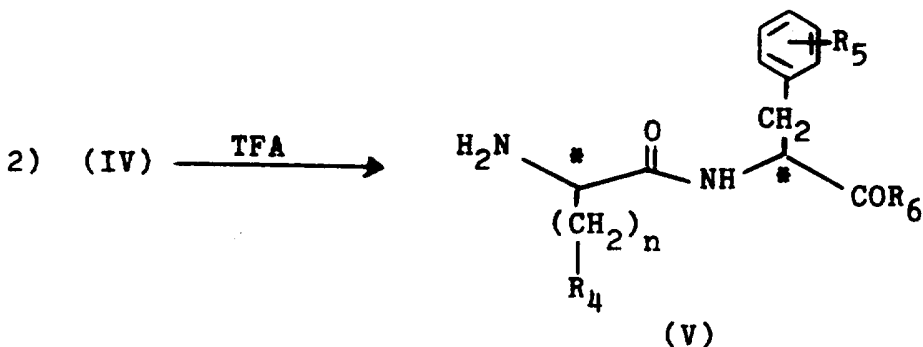
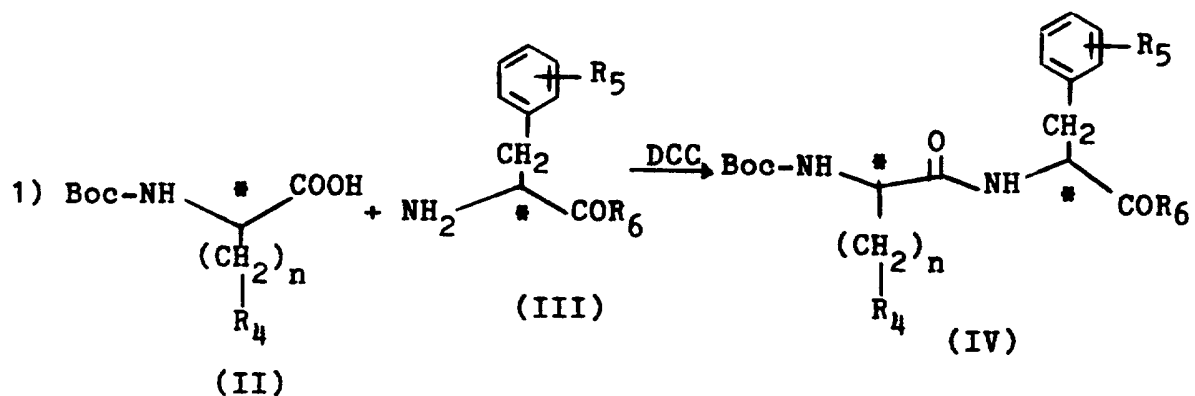
- 8ª -


Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a formação da ligação de péptido ocorrer por reacção do grupo amino com um anidrido misto preparado localmente utilizando um clorocarbonato de alquilo ou por reacção do grupo amino com um derivado activo do carboxilo.

- 23 -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se formar directamente a ligação de péptido entre o grupo amino e o grupo carboxi por intermédio de uma carbodiimida.

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, quando os grupos hidroxil e carboxil forem livres e o grupo amino for primário na fórmula (I), a síntese dos derivados de péptido se efectuar de acordo com o seguinte esquema reaccional:





-NH₂ livre assim obtido de acordo com um dos processos conhecidos de acilação, e finalmente uma desbenzilação catalítica com hidrogénio e Pd/C.

- 12ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as reacções sequenciais em fase sólida implicarem a esterificação de um copolímero de estireno-divinil-benzeno clorometilado (resina de Merrified) com o aminoácido com terminal carboxi possuindo o grupo amino (por exemplo como Boc) e, se presentes, os grupos hidroxí fenólicos da cadeia lateral protegidos, e em seguida isolar-se o composto de aminoácido-resina protegido e determinar-se o grau de esterificação, remover-se o grupo N-protector, e após tratamento com trietanolamina se efectuarem as condensações dos aminoácidos com N central e terminal protegidos, e clivar-se o composto resultante da resina e N,O-desproteger-se e o grupo amino ser desprotonado por meio de uma base, e opcionalmente inserirem-se substituintes nos grupos amino e/ou hidroxí e carboxi de acordo com a fórmula geral (I) nos aminoácidos adequados antes das reacções de condensação de péptido ou no final da cadeia de péptido já formada.

- 13ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se prepararem os sais nos grupos amino (quando R e R₁=-H, alquilo) ou carboxi (quando ele é livre) por tratamento com quantidades equivalentes de ácidos ou bases em soluções aquosas ou orgânicas.

A requerente reivindica a prioridade do pedido italiano apresentado em 28 de Agosto de 1989, sob o nº. 21567 A/89.

- 26 -

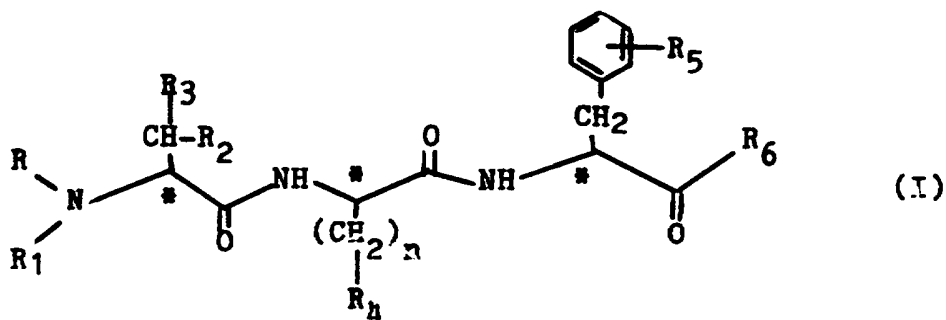
Lisboa, 28 de Agosto de 1990.
O AGENTE OFICIAL DA PROTECÇÃO INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke.


RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PÉPTIDO FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de derivados de péptido com a fórmula geral (I), possuindo propriedades analgésicas, antivirais, farmacologicamente imuno-moduladoras, e dos seus sais formados no grupo amino ou carboxílico, desde que esses grupos sejam livres,



e os derivados em que os grupos hidroxí nas cadeias laterais de Ser Thr, Tyr e DOPA, e os grupos carboxí na cadeia lateral de Asp e Glu são modificados para se obterem derivados de éter ou éster e derivados de éster ou amida primária, respectivamente, e também dos derivados em que o grupo amino terminal é substituído com grupos alquilo, acilo ou alcóxicarbonilo, e em que a fórmula (I) inclui não só aminoácidos na configuração-L "natural", mas também péptidos em que um, dois ou todos de entre os três aminoácidos têm a configuração-D "não natural", ou são totalmente ou parcialmente racémicos e bem assim de todos os diastereoisómeros e racematos possíveis, os sais obtidos com ácidos farmacologicamente aceitáveis, quer inorgânicos e com aminoácidos "ácidos" os sais de um ou de outro ou de ambos obtidos com bases farmacologicamente aceitáveis, quer inorgânicos e orgânicos e com aminoácidos "básicos" que compreende os três aminoácidos ou seus derivados que formam os derivados de pépti-



do serem condensados em série, e, se necessário, os derivados de péptido serem salificados.