

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 97 583

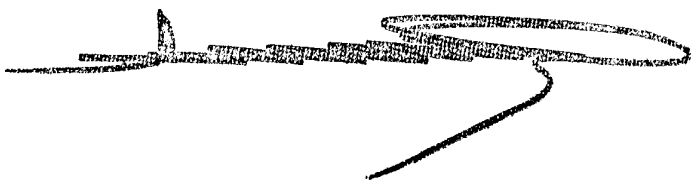
REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em
D-3550 Marburg, República Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTIDAMIDAS E DE
COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE AS CONTÊM ÚTEIS CO
MO INIBIDORES DA COAGULAÇÃO POR FIBRINA/TROMBINA"

INVENTORES: Dr. Werner Stüber e Dr. Karl Fickenscher

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

República Federal Alemã, 08 de Maio de 1990, sob. o nº P 40 14 655.3



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Werner Stüber e Dr. Karl Fickenscher, residentes na República Federal Alemã), para: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTIDAMIDAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM ÚTEIS COMO INIBIDORES DA COAGULAÇÃO POR FIBRINA/TROMBINA".

DESCR I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a oligopeptidamidas bem como a um processo para a sua preparação. Os compostos descritos possuem a capacidade de inibir a formação de coágulos no sangue, isto é, a coagulação sanguínea. Em consequência estes peptídeos apresentam interesse terapêutico e para diagnóstico.

De acordo com o estado da técnica são conhecidos compostos que possuem a capacidade de inibir a coagulação sanguínea. Estas substâncias são entre outras derivados peptídicos e proteínas. Estão nestes casos a antitrombina III que é usada em terapia e as clorometilcetonas peptídicas que são usadas em diagnóstico. A actividade destas substâncias baseia-se na inibição da trombina, o que significa que não permitem que o fibronogénio forme a fibrina e que o factor XIII seja activado.

ACL



Para diversos fins de diagnóstico é no entanto de interesse activar integralmente a cascata de coagulação sanguínea com formação de trombina ou adicionar directamente trombina à substância a ensaiar sem no entanto deixar que se estabeleça um coágulo. Isto significa que é necessário utilizar inibidores da coagulação que possuam a capacidade de inibir, na formação de um coágulo, a fibrina já formada pela trombina.

Para a utilização terapêutica é de interesse interromper a formação de um coágulo de fibrina na presença de fibrina solúvel. Para este fim pode ser útil a inibição da oclusão das arteríolas num coágulo intravasal disseminado ou a interrupção de uma formação de novo de um coágulo de fibrina por meio de uma terapia de lise com manutenção da actividade local de coagulação.

Conforme se mostrou na publicação de patente 38 11 647, é possível estabelecer um sistema de ensaio para o factor de coagulação XIII por adição de um inibidor de coagulação. O inibidor de coagulação adicionado não inibe a trombina mas sim a reunião das cadeias da fibrina solúvel. O peptídeo usado tem a sequência peptídica Gly-Pro-Ars-Pro. Contudo persiste o inconveniente de que se torna necessário adicionar uma quantidade relativamente elevada deste peptídeo para uma inibição completa da coagulação. O mesmo acontece também para a utilização terapêutica deste tetrapeptídeo.

No 11º Simpósio Americano de Peptídeos (Julho de 1989) foram apresentados vários derivados peptídicos activos (o significado das abreviaturas é explicado mais adiante):

Estrutura	Actividade relativa (Quantidade no plasma com a qual é inibida uma quantidade definida do inibidor)
GPRP	1
GPRP-4-hidroxipiperidideo	1,2
GPRP-3-metilpiperidideo	1,29
GPRP-NH ₂	3,52

GPRPP-NH₂

4,56

O aumento de actividade dos peptídeos referidos está relacionado com a incorporação de derivados de aminas cíclicas como bloco C-terminal.

O objectivo da presente invenção era encontrar peptídeos ainda mais potentes do que os conhecidos de acordo com o estado da técnica.

Constituem um objecto da presente invenção por conseguinte amidas peptídicas da fórmula geral I



em que G significa o ácido aminado glicina, P significa o ácido aminado L-prolina, R significa o ácido aminado L-arginina, X significa um ácido aminado proteínogénico excepto prolina ou um dipeptídeo destes ácidos aminados incluindo prolina, N significa azoto e R₁ e R₂ são iguais ou diferentes e significam hidrogénio ou uma cadeia de alquilo com um máximo de 4 átomos de carbono.

Como exemplo podem referir-se os seguinte peptídeos:

GPRPA-NH₂, GPRPS-NH₂, GPRPK-NH₂, GPRPF-NH₂, GPRPG-NH₂, GPRPW-NH₂, GPRPY-NH₂, GPRPV-NH₂, GPRPI-NH₂, GPRPD-NH₂, GPRPE-NH₂, GPRPG-N(etilo)₂, GPRPG-N(etilo)₂, GPRPS-N(isoprilo)₂, GPRPW-N(metilo)₂, GPRPG-N(butilo)₂, GPRPPP-NH₂, GPRPGG-NH₂, GPRPPR-NH₂, GPRPRP-NH₂, GPRPPP-NH(isopropilo)₂, GPRPAG-NH₂, GPRPGG-NH₂.

Os ácidos aminados cuja forma estereoquímica não se encontra definida acima encontram-se de preferência na forma L, mas podem também apresentarem-se sob a forma D.

A preparação dos derivados peptídicos da presente invenção é efectuada por métodos conhecidos em si, utilizando-se para a síntese das amidas não alquiladas (R1 e R2 iguais a hidrogénio) o método de síntese em fase sólida. De preferência seguem-se os procedimentos descritos em int. J. Peptide Protein Res. 34, 215-221, 1989.

Os peptídeos foram de preferência preparados em copolímero de poliestireno-divinilbenzeno com ligações



cruzadas a 1%, que tinha sido derivatizado com uma função de ancoragem de amida sensível aos ácidos.

A síntese foi conduzida através do acoplamento repetitivo de ácidos aminados protegidos um a um de extremidade C para a extremidade N do peptídeo. Os ácidos aminados são protegidos de forma correspondente à sua estrutura química no átomo de azoto N- α e eventualmente na função em terceiro lugar. As funções azotadas (N- α) foram protegidas com o grupo Fmoc, os grupos laterais alcoólicos sob a forma de éteres terc-butílicos, os grupos carboxilo da cadeia lateral sob a forma de éteres de terc-butilo e o grupo guanidina com o grupo Mtr ou Pmc.

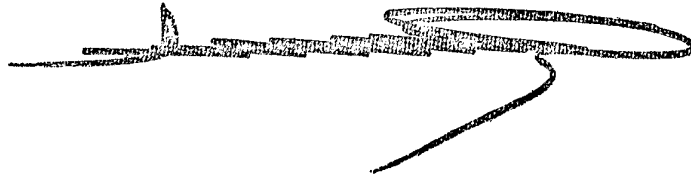
A preparação dos peptídeos foi levada a efeito neste caso com inclusão das seguintes fases num sintetizador semi-automático ou totalmente automático:

- lavagem da resina (15 ml/g de resina)
solvente DMF (ou diclorometano ou N-metilpirrolidona)
- hidrólise dos grupos Fmoc com piperidina a 20% em DMF
- lavagem da resina com DMF (ou N-metilpirrolidona)
- acoplamento do ácido aminado por utilização de um agente de condensação como por exemplo uma carbodiimida, eventualmente com adição de HOBT ou em vez desta adição com utilização de um anidrido misto ou simétrico ou de um éster activo.
- após terminado o acoplamento arrastamento por lavagem dos reagentes em excesso (DMF).

O último ácido aminado normalmente utilizado é um ácido aminado protegido por um grupo Boc.

O peptídeo foi em seguida separado com uma mistura de ácido trifluoroacético, de preferência a 90% , e na presença de um aceitador, como etanoditiol, água, resorcina, anisolo ou tioanisolo, isolado ou numa mistura de aceitadores durante 1 a 2 horas à temperatura ambiente ou a uma temperatura até 40°C. Os peptídeos foram cristalizados por precipitação num éter e purificados por permeação em gel. A pureza dos peptídeos foi verificada por HPLC e análise de ácidos aminados.

A síntese das penta- e hexapeptídiqui-



lamidas foi efectuada de acordo comp os métodos clássicos em solução.

Em primeiro lugar acoplaram-se os ácidos aminados protegidos (Boc ou Z) à alquilamina correspondente utilizando-se métodos idênticos aos usados na síntese em fase sólida. Os produtos intermediários forma purificados por métodos físicos, por recristalização, extracção e precipitação. Depois da separação dos grupos protectores N-terminais, no caso do grupo Boc por acidólise com HCl 1,2 N em ácido acético glacial ou com TFA a 50% em diclorometano, no caso do grupo Z por hidrogenólise, acoplou-se o ácido aminado seguinte conforme descrito anteriormente. No caso da arginina utiliza-se normalmente um grupo protector no grupo guanidina, grupo este que é fácilmente protonado.


Após eliminação de todos os grupos protectores purificaram-se os peptídeos como habitualmente. para este fim usaram-se métodos como a permeação em gel e inclusivamente também uma purificação por HPLC em material RP-18. Os compostos forma analisados por HPLC e análise de ácidos aminados, comprovando-se a sua estrutura e homogeneidade por espectroscopia $^{13}\text{C-NMR}$.

Os peptídeos da presente invenção foram também ensaiados para verificação da sua actividade inibidora. Para este fim utilizou-se uma amostra de plasma com inibidor e após adição de trombina determinou-se o tempo que decorreu até a amostra coagular. Nos exemplos apresenta-se um resultado representativo.

Conforme se verificou, os peptídeos da presente invenção possuem em relação aos compostos conhecidos um potencial de inibição nitidamente elevado.

No caso das amidas pentapeptídicas verificou-se surpreendentemente que é possível usar para ácido aminado C-terminal ácidos aminados de pequena dimensão, como a glicina e a alanina. De acordo com o estados da técnica são no entanto preferidas neste caso estruturas cíclicas como as derivadas da prolina ou da piperidina.

Abreviaturas:



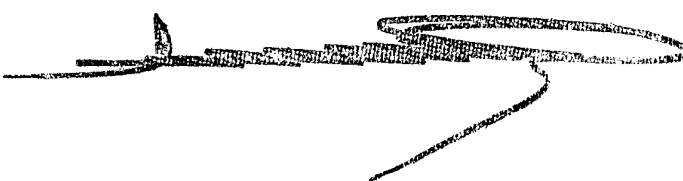
Ala = A Alanina
Asp = D Ácido aspártico
Asn = N Asparagina
Gly = G Glicina
Val = V Valina
Leu = L Leucina
Ile = I Isoleucina
Ser = S Serina
Thr = T Treonina
Met = M Metionina
Pro = P Prolina
Lys = K Lisina
Arg = R Arginina
Glu = E Ácido glutárico
Gln = Q Glutamina
Phe = F Fenilalanina
Tyr = Y Tirosina
Trp = W Triptofano
HOBT Hidroxibenzotriazolo
DIC Diisopropilcarbodiimida
TFA Ácido trifluoroacético
Z Benziloxicarbonilo
Boc Butiloxicarbonilo
Fmoc Fluorenilometiloxicarbonilo
Pmc Pentametilcromanossulfonilo
DMF Dimetilformamida

O exemplo que se segue destina-se a elucidar mais completamente a presente invenção:

Exemplo:

Preparação de Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-NH₂

Lavou-se 1g de Fmoc-amida-âncora-resina (0,47 mmol de grupos amina/g) 3 vezes com 15ml de DMF e eliminaram-se os grupos Fmoc com piperidina a 20% em DMF (1 x 3min; 1 x 10min).



Lavou-se a resina 2 vezes com DMF e 2 vezes com isopropanol. Em seguida incubaram-se durante uma hora com a resina 2 mmol de Fmoc-Ala com 3 mmol de HoBt e 2,2 mmol de DIC em 15ml de DMF. Em seguida eliminaram-se por filtração os reagentes em excesso e lavou-se a resina 2 vezes com DMF e 2 vezes com isopropanol. Verificou-se se a reacção estava completa com um ensaio de ninidrina e no caso de não estar completa repetiu-se o acoplamento. Os restantes ácidos aminados foram também acoplados de acordo com este método. O último ácido aminado foi utilizado protegido com um grupo Boc. Lavou-se o conjunto peptídeo-resina com metanol e éter dietílico e secou-se sob vácuo. Tratou-se a resina com 20ml de uma mistura de 90% de TFA e 10% de etanoditiol durante 1 hora a 35°C. Cristalizou-se o peptídeo dissolvido em éter e cromatografou-se em RSehadex-G25 com ácido acético a 0,5%. Liofilizaram-se as fracções que continham o peptídeo e verificou-se por HPLC que tinha uma pureza de 95%. Por análise de ácidos aminados verificou-se um conteúdo em peptídeo de 68%.

Verificação:

A 25 microlitros de plasma adicionaram-se 100 microlitros do inibidor de coagulação (peptídeo) de diferentes concentrações. A transformação do fibrinogénio em fibrina foi desencadeada por adição de 25 microlitros de trombina (50 UI/ml). Seguiu-se a transformação da mistura por meio da medição da turvação num analisador de coagulação (ACL 300 com calculador incluído).

Numa segunda amostra adicionaram-se a 100 microlitros de plasma, 50 microlitros da solução do peptídeo e 50 microlitros da solução de trombina e efectuou-se a medição da turvação como anteriormente. Considerou-se como inicio da coagulação o momento em que a luz dispersa aumentou de uma quantidade igual à prevista pelo fabricante do aparelho (Instrumentation Laboratory, Milão) para a determinação do tempo de protrombina em amostras de plasma.

Todos os peptídeos considerados são peptidamidas ($R_1 = R_2 = H$). Os valores dados são tempos de coagulação em segundos.



Ensaio I
100 µl de inibidor de coagulação
25 µl de plasma
25 µl de trombina

Tempos de coagulação em segundos

Concentração do
inibidor de coagulação
mg/ml

2 1 0,5 0,25 0,125 0,06

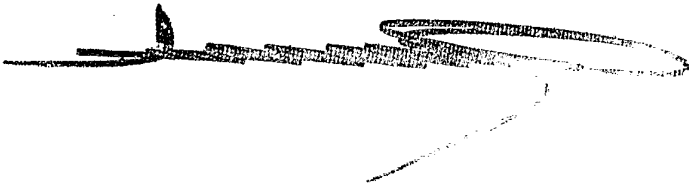
Peptidamida

GPRPPP	592,2	498,1	201,7	76,3	28,8	21,2
GPRPG	999,9	718,5	229,3	73,5	27,9	20,3
GPRPPR	493,4	310,9	109,6	66,8	30,7	21,2
GPRPRP	574,1	617,8	205,5	79,2	32,6	21,2
GPRPA	635,9	535,0	300,5	148,5	51,6	24,1
GPRPD	430,7	166,6	45,9	22,2	20,3	21,2
GPRPW	879,1	726,1	190,3	70,6	26,9	20,3
GPRPK	258,1	139,9	173,2	102,0	51,6	25,0
GPRPS	115,3	114,3	83,3	41,2	23,1	20,3
GPRP	494,3	181,8	48,8	23,1	20,3	20,3
GPRPP	699,5	425,9	228,3	73,5	28,8	
GPRPV	174,2	225,5	148,5	83,0	32,6	
GPRPI	785,0	968,4	181,8	57,3	25,9	
GPRPF	482,9	196,0	88,7	33,6	21,2	
GPRPAG	201,7	191,3	142,8	84,9	33,6	
GLRPG	25,0	25,0	25,0	24,1	24,1	

Ensaio II
50 µl de inibidor de coagulação
100 µl de plasma
50 µl de trombina

Tempos de coagulação em segundos

Concentração do
inibidor de coagulação



mg/ml	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
-------	---	---	-----	------	-------	------

Peptidamida

GPRPPP	316,7	61,1	-	19,3	19,3	20,3
GPRPG	126,7	43,1	20,3	18,4	19,3	19,3
GPRPPR	89,6	32,6	19,3	18,4	19,3	19,3
GPRPRP	106,7	36,4	19,3	18,4	19,3	19,3
GPRPA	448,7	83,9	25,9	19,3	19,3	19,3
GPRPD	350,9	48,8	47,8	19,3	20,3	20,3
GPRPW	85,8	25,0	19,3	19,3	19,3	20,3
GPRPK	113,4	35,5	19,3	18,4	19,3	19,3
GPRPS	77,3	25,0	18,4	18,4	19,3	20,3
GPRP	31,7	19,3	19,3	19,3	20,3	20,3
GPRPP	293,7	60,2	21,2	18,4	19,3	19,3
GPRPV	168,4	43,1	20,3	18,4	19,3	
GPRPI	93,4	27,9	19,3	18,4	20,3	
GPRPF	47,8	20,3	18,4	19,3	19,3	
GPRPAG	195,1	49,7	20,3	18,4	19,3	
GLRPG	21,2	21,2	21,2	20,3	21,2	

Ensaio III

20 µl de inibidor de coagulação com trombina
130 µl de plasma

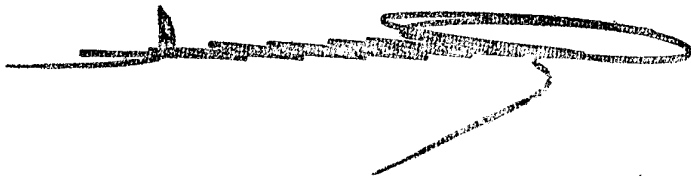
Tempos de coagulação em segundos

Concentração do
inibidor de coagulação

mg/ml	10	5	2,5	1,25	0,625
-------	----	---	-----	------	-------

Peptidamida

GPRPPP	43,1	85,8	35,5	20,3	18,4
GPRPG	656,8	104,8	40,2	19,3	18,4
GPRPPR	209,3	70,6	28,8	19,3	18,4
GPRPRP	323,3	77,3	28,8	18,4	18,4
GPRPA	999,9	272,9	76,3	25,0	18,4
GPRPD	101,0	24,1	18,4	18,4	17,4
GPRPW	155,2	38,3	19,3	18,4	18,4
GPRPK	575,1	114,3	41,2	20,3	18,4

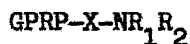


GPRP	926,6	86,7	22,2	18,4	18,4
GPRPP	327,7	97,2	37,3	20,3	18,4
GPRPV	69,7	109,6	43,1	20,3	18,4
GPRPI	448,7	107,7	32,6	19,3	18,4
GPRPF	261,6	59,2	20,3	18,4	18,4
GPRPAG	22,2	71,6	45,0	20,3	18,4
GLRPG	18,4	18,4	18,4	18,4	18,4

REIVINDICAÇÕES

1ª

Processo para a preparação de um peptidamida da fórmula geral I



I

em que G significa o ácido aminado glicina, P significa o ácido aminado L-prolina, R significa o ácido aminado L-arginina, X significa um ácido aminado proteigénico com a excepção de prolina ou um dipeptídeo destes ácidos aminados incluindo prolina, N significa azoto e R_1 e R_2 são iguais ou diferentes e significam hidrogénio ou uma cadeia de alquilo inferior com um máximo de 4 átomos de carbono, caracterizado por se acoplarem sucessivamente ácidos aminados protegidos, derivados de ácidos aminados ou segmentos peptídicos em solução ou sobre uma fase sólida e se eliminarem por cisão os grupos protectores, bem como, no caso da síntese em fase sólida, se recuperar por cisão da resina de suporte o peptídeo da estrutura I.

2ª

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por X ser um ácido aminados seleccionado de entre o grupo Gly ou Ala e R_1 e R_2 serem hidrogénio.

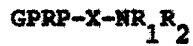
3ª



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTIDAMIDAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE AS CONTEM ÚTEIS COMO INIBIDORES DA COAGULAÇÃO POR FIBRINA/TROMBINA".

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma peptidamida da fórmula geral I



I

que compreende acoplarem-se sucessivamente ácidos aminados protegidos, derivados de ácidos aminados ou segmentos peptídicos em solução ou sobre uma fase sólida e eliminarem-se por cisão os grupos protectores, bem como, no caso da síntese em fase sólida, recuperar-se por cisão da resina de suporte o peptídeo da estrutura I.