

(11) Número de Publicação: **PT 1805203 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 1/04 (2007.10) **C07K 1/06** (2007.10)
C07K 7/06 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.10.18	(73) Titular(es): LONZA AG MUNCHENSTEINERSTRASSE 38 4052 BASEL CH
(30) Prioridade(s): 2004.10.19 EP 04024813 2005.04.25 EP 05008979	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.07.11	(72) Inventor(es): OLEG WERBITZKY CH STÉPHANE VARRAY CH THOMAS ZEITER CH
(45) Data e BPI da concessão: 2010.01.13 074/2010	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

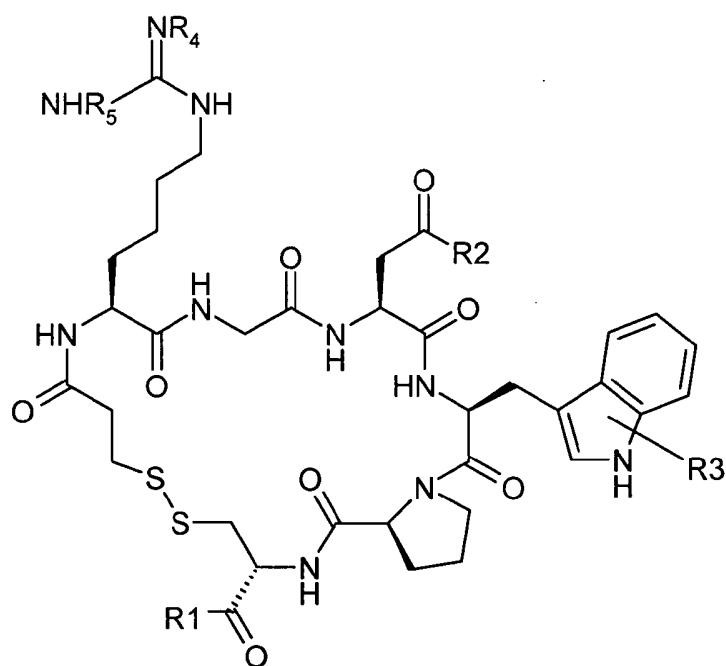
(54) Epígrafe: **CICLIZAÇÃO DE PÉPTIDOS SOBRE RESINA**

(57) Resumo:

RESUMO

"CICLIZAÇÃO DE PÉPTIDOS SOBRE RESINA"

É delineado um novo composto de fórmula (I)



I

DESCRIÇÃO
"CICLIZAÇÃO DE PÉPTIDOS SOBRE RESINA"

A presente invenção relaciona-se com um método de formação de ligação di-sulfureto em síntese de péptidos em fase sólida (SPPS).

Pode ser empregue uma grande variedade de grupos protectores para protecção de resíduos de cisteína, e.g. tritilo, acetamidometil-, t-butilo, trimetilacetamidometilo, 2,4,6-trimetoxibenzilo, metoxitritilo, t-butilsulfenilo.

Mais comumente, o grupo tritilo é empregue para protecção comum de cadeia lateral de cisteína durante a síntese de péptidos. Para protecção de cisteínas que são subsequentemente ciclizadas a cistina, tem sido mais vastamente empregue o grupo protector acetamidometilo (acm)- juntamente com oxidação de iodo (Kamber et al., 1980, *Helv. Chim. Acta* 63, 899-915; Rietman et al., 1994, *Int. J. Péptidos Protein Res.* 44, 199-206).

Foi descrito um grande número de agentes oxidantes para além do iodo como permitindo a formação de cistina em ciclização em fase líquida (exemplos derivados de Albericio et al., em: Chan and White, eds., 'FMOC Solid-phase Peptide Synthesis', Oxford University Press 2000, p. 91 a 114: glutationa em tampão aquoso, DMSO, ferricianeto de potássio, reagente de Ellman 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), iodo, trifluoroacetato de tálio(III), alquiltriclorosilano-sulfóxido, oxidação mediada por

trifluorometanossulfonato de prata - DMSO em meio fortemente ácido.

Usualmente, todos esses métodos originam produtos secundários múltiplos, indesejáveis e requerem tempos reacionais longos na gama de 10 - 20 horas para um rendimento óptimo.

Volkmer-Engert *et al.* (J. Peptide Res. 51, 1998, 365-369) descrevem a formação oxidativa de ligações dissulfureto catalisada por carvão vegetal através da utilização de oxigénio dissolvido no solvente aquoso. Os controlos cuidadosos provaram que o reservatório de oxigénio dissolvido fisicamente no meio aquoso foi necessário e suficiente para carregar o carvão vegetal com oxigénio para a oxidação. A utilização de carvão vegetal, quando comparada com a tradicional aspersão com ar na ausência de catalisador, acelerou dramaticamente a velocidade da reacção.

A utilização de carvão vegetal requer inevitavelmente que essa reacção seja realizada em solução homogénea mas não sobre resina; os passos de desprotecção subsequentes não tolerariam a presença continuada de carvão vegetal que é contudo impossível de remover da fase sólida resina de péptido.

A WO 03/093302 descreve a ciclização de um péptido contendo triptofano em solução após libertação de uma fase sólida. O péptido possui uma cisteinilcarboxamida C-terminal cuja função tiol da cadeia lateral está desprotegida e cujo péptido é adicionalmente derivatizado N-terminalmente quer com uma unidade 3-mercaptopropionamida ou com uma unidade

3-[(2-carboxietil)ditio]propionamida. A protecção e/ou desprotecção da cadeia lateral da cisteína amida é tornada supérflua através da ancoragem da cadeia lateral do péptido na resina por uma ligação tioéster da referida cadeia lateral da cisteína. A derivatização N-terminal com ditiopropionato ocorre antes da clivagem da resina. A ciclização ocorre após clivagem a partir da resina, então em solução, através da formação de uma ponte dissulfureto entre a cisteína e a unidade tiopropionamida. Neste esquema, é mandataria a clivagem do suporte sólido e desprotecção global, excepto para a função tiopropionilo, antes da ciclização.

Como uma desvantagem, tem que ser aplicado o maior cuidado com vista à preservação da unidade tiopropionamida durante a clivagem e desprotecção global. Atherton *et al.* (1985, J. Chem. Perkin Trans. I., 2065) reportaram que a utilização popular de tioanisol possuindo função dual quer como lavador e como promotor de acidólise para clivagem da resina resultou também em desprotecção parcial, prematura de cisteínas protegidas com acm, *terc*-butilo e *terc*-butilsulfenilo. A via sintética global é intrincada, os muitos passos envolvidos afectam negativamente os rendimentos obteníveis por este modo. A ciclização tem que ser levada a cabo em solução altamente diluída para prevenir a dimerização. De facto, na descrição não é dada indicação explícita dos rendimentos obtidos.

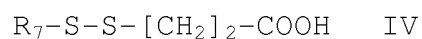
É um objectivo da presente invenção delinear um método mais simples e directo, melhorado ou outro novo para sintetizar péptidos cíclicos ligados por dissulfureto através de síntese em fase sólida. Este objectivo é resolvido, de

acordo com a presente invenção, por um método de síntese de péptidos compreendendo os passos de

a. sintetizar um péptido ligado a uma fase sólida cujo péptido compreende pelo menos um cisteína, resíduo homo- ou nor-cisteína, cuja cisteína está protegida na sua cadeia lateral por um grupo *S-terc*-butilsulfenilo, e

b. ou acoplar N-terminalmente um aminoácido adicional possuindo um radical 3-[2-carboxietil)ditio]propionilo no seu $N\alpha$ ou,

opcionalmente, desproteger o $N\alpha$ do aminoácido N-terminal e fazer reagir o $N\alpha$ com 3,3'-ditiopropionimida para originar a $N\alpha$ -3-[(2-carboxietil)-ditio]propionamida correspondente, ou desproteger o $N\alpha$ do aminoácido N-terminal e fazer reagir o $N\alpha$ livre com um composto de fórmula IV



em que R_7 é aril- , incluindo heteroaril-, ou é aralquil-, alquilaril- ou alquil- o qual poderá ser adicionalmente substituído com halogéneo, amido, éster e/ou éter, e

c. fazer reagir adicionalmente os péptidos com um reagente removedor de grupo protector *S-terc*-butilsulfenilo, preferencialmente fazendo reagir os péptidos com uma trifenil- ou trialquilfosfina substituída ou não substituída, e

d. ciclizar os péptidos através da formação da ligação dissulfureto entre, formalmente, a cisteína e a unidade 3-tiopropionamida no $N\alpha$, na presença de ar e/ou oxigénio.

O péptido de acordo com a presente invenção poderá ser qualquer péptido compreendendo aminoácidos naturais ou não naturais tais como e.g. homocisteína, homoarginina, D-ciclohexilalanina, penicilamina (Pen) ou ornitina (Orn). Os termos estrutura ou cadeia principal do péptido, cadeia lateral e os prefixos 'nor-' 'homo-' são construídos no presente contexto de acordo com as definições da IUPAC-IUB (Joint IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 'Nomenclature and symbolism for amino acids and Peptides', Pure Appl. Chem., 56, 595-624 (1984)). No seu significado preferido, mais restrito, 'homo-' significa apenas um grupo metileno extra de ligação na porção de cadeia lateral.

Tem que ser tomada particular atenção à protecção adicional da cadeia lateral, em particular quando se refere a cisteína adicional, resíduos homo- ou nor-cisteína compreendidos na sequência do péptido que se pretende que se mantenham protegidos durante e que não participem na reacção de ciclização. Preferencialmente, tais unidades sulfidrido adicionais compreendendo resíduos são protegidas por grupos protectores não sensíveis a triálquilfosfina, mais preferencialmente, o tal grupo protector de sulfidrido não sensível é seleccionado a partir do grupo que compreende os grupos protectores tritil-, terc-butil-, acetamidometil-, acetamidometil- alquilado, tritil-alquilado. A nível geral, os grupos protectores de cadeia lateral como comumente empregues na técnica (ver e.g. Bodansky, M., Principles of Peptide Synthesis, s. adiante) poderão ser utilizados para proteger cadeias laterais susceptíveis que poderiam de outro modo ser modificadas nos ciclos de Acoplamento e desprotecção. Exemplos de aminoácidos com cadeias laterais susceptíveis são Cys, Asp,

Glu, Ser, Arg, Homo-Arg (Har), Tyr, Thr, Lys, Orn, Pen, Trp, Asn e Gln. Alternativamente, poderá ser levada a cabo uma modificação química pós-síntese de fase sólida do péptido amida para originar uma cadeia lateral desejada. Por exemplo como descrito amplamente em diferentes referências (EP-301 850; Yajima *et al.*, 1978, J. Chem. Soc. Chem. Commun., p. 482; Nishimura *et al.*, 1976, Chem. Pharm. Bull. 24:1568), a homoarginina pode ser preparada por guanidação de um resíduo de lisina compreendido na cadeia de péptidos ou uma arginina pode ser preparada por guanidação de um resíduo de uma ornitina compreendido na cadeia de péptidos, embora esta seja apenas uma opção menos preferida, mais laboriosa. Notavelmente, o acoplamento *e.g.* de Har requer tempos de acoplamento longos e o reabastecimento de reagentes de acoplamento. De acordo com a presente invenção, é uma concretização preferida acoplar Arg ou Har, preferencialmente quando utilizada como Fmoc-Arg e Fmoc-Har respectivamente, sem a utilização de grupos protectores de cadeia lateral. Isto poderá ser conseguido assegurando que após o acoplamento do resíduo individual de Arg ou Har, a unidade guanidina é quantitativamente protonada antes de quaisquer reacções de acoplamento adicionais e forma um par iónico estável com o protão doador no solvente orgânico. Isto é preferencialmente conseguido através do tratamento do péptido amida ligado à resina com um excesso do auxiliar de acoplamento ácido BtOH ou semelhante como descrito em mais detalhe como uma concretização preferida adiante na secção experimental. Outro exemplo de lavagem da carga do grupo guanidínio é utilizar sais tetrafenilborato de HAR protegidos com Fmoc para síntese como indicado na US 4 954 616.

Exemplos de grupos protectores adequados para cadeias laterais aminoácido individual ocorrendo em concretizações preferidas do péptido de acordo com a presente invenção são:

Preferencialmente, a cadeia lateral arginina poderá ser opcionalmente protegida covalentemente durante a síntese e.g. com tosilo, benziloxicarbonilo, pentametilenocromanossulfonilo (Pmc), pentametildihidrobenzofuransulfonilo (Pbf), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenossulfonilo (Mtr) e seu homólogo 4-^tBu-2,3,5,6-tetrametilo (Tart), adamantiloxicarbonilo ou Boc. Pmc, Pbf, Mtr ou Tart são fortemente preferidos para proteger Arg, mais preferencialmente é Pbf.

O Trp é preferencialmente protegido durante a síntese com Boc. Opcionalmente, poderá ser N-protegido com formilo ou sim-mesitilenossulfonilo.

Grupos protectores de cadeia lateral de ácido carboxílico adequados, através de esterificação do grupo carboxi da cadeia lateral, são e.g. adamantilo, *terc*-butilo, alilo, benzilo (Z), preferencialmente o grupo carboxi é protegido por conversão num éster *terc*-butilo. É necessário referir que a remoção dos citados grupos protectores poderá requerer diferentes químicas de desprotecção, como é bem conhecido (ver Bodansky, M., adiante).

O suporte de fase sólida ou resina poderá ser qualquer suporte conhecido na técnica que seja adequado para utilizar numa síntese de fase sólida. Esta definição de fase sólida compreende que o péptido esteja ligado ou unido através de um ligante funcional ou grupo de suporte à fase

sólida ou resina, estando tal ligante implicado quando se fala de 'fase-sólida' no presente contexto. Exemplos de fases sólidas são e.g. suportes de poliestireno que poderão ser adicionalmente funcionalizados com e.g. *p*-metilbenzidrilamina por exemplo, ou suportes funcionalizados rígidos tais como poli-dimetilacrilamida encapsulada por Kieselguhr (pepsina K), sílica ou vidro de poro controlado. A matriz da resina da fase sólida poderá também ser constituída por uma resina anfifílica de poliestireno-PEG (e.g. Tentagel, ver US-4908405) ou resina PEG-poliamida ou PEG-poliéster, e.g. Kempe et al., J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 7083; também vide US 5 910 554, US 2003078372 A1. A pureza do produto obtido em tais resinas PEG misturadas é melhor que em resinas tradicionais, no entanto o carregamento da resina é usualmente menos eficiente e/ou a estabilidade química em particular em meios ácidos é frequentemente não satisfatória. As resinas de poliestireno-PEG atingem carregamentos superiores, mas é obtida menor anfifilicidade devido ao teor de PEG ter decrescido.

Preferencialmente, o suporte sólido é baseado num poliestireno, PEG tal como e.g. especialmente um PS-PEG anfifílico ou uma matriz ou resina polimérica de polidimetilacrilamida.

De acordo com a presente invenção, o péptido poderá estar ligado através de uma cadeia lateral de aminoácido, tipicamente a cadeia lateral do aminoácido C-terminal a menos que tal amino ácido seja o verdadeiro resíduo de cisteína protegido por S-*t*-Bu-sulfenilo de acordo com a presente invenção, ou poderá estar ligado através do grupo α -carboxi C-terminal a uma resina através de uma ligação

éster, tioéster ou amida. Exemplos são suportes sólidos possuindo aminometilo, carboxilo ou bromometilo ou radicais iodometilo por exemplo ou cujos suportes são derivatizados por ligantes ou sítios de suporte conhecidos tais como e.g. Wang, tritilo, 2-clorotritilo-, 4-metoxitritilo-, 'amida de Rink' 4-(2',4'-dimetoxibenzil-aminometil)fenoxi-, resina de Sieber 9-amino-6-fenilmetoxixanten-, 4-hidroximetilfenoxiacetil- ou ácido 4-hidroximetilbenzóico (o último requerendo ligação do primeiro aminoácido através de protocolo de esterificação catalisado por *p*-dimetilaminopiridina pode resultar então em racemização de aminoácidos susceptíveis, e.g. Trp e em particular cisteína, ver Atherton, E. et al., 1981, J. Chem. Soc. Chem. Commun., p.336 ff). Os métodos de providenciar ligações tioéster a uma resina são revelados em detalhe e são referenciados adicionalmente em WO 04/050686. Numa concretização preferida da presente invenção, são apresentadas as ligações tioéster para a ligação da unidade de péptido à fase sólida, sendo portando vulneráveis a 20 % de piperidina e ainda a tratamento com nucleófilos tais como a trifenilfosfina.

A amida de Rink, resina de Sieber (Tetrahedron Lett. 1987, 28, 2107-2110) ou resinas do tipo 9-amino-xantenilo similares, resinas PAL (Albericio et al., 1987, Int. J. Pept. Protein Research 30, 206-216) ou os derivados de tritilamina especialmente substituídos de acordo com Meisenbach et al., 1997, Chem. Letters , p. 1265 f.) são exemplos de um ligante ou sítio de suporte a partir do qual é gerada uma C α -carboxamida ou libertada por clivagem do péptido a partir da resina ou fase sólida. É necessário referir que a utilização de tais ligantes amida é com certeza dependente do tipo de síntese de fase sólida levada

a cabo, *i.e.* se é Boc tradicional ou agora habitual, química de protecção Fmoc ortogonal que é utilizada para acoplamento; o ligante de resina de amida específica para Boc é PAM, por exemplo. Concordantemente, as fases sólidas que compreendem tais grupos ligantes são denominadas 'fases sólidas produtoras de amida' no contexto presente.

Preferencialmente, o péptido é ancorado à fase sólida quer por uma ligação amida ou éster através da terminação C. Mais preferencialmente, a fase sólida é uma fase sólida sensível a ácido ou lábil relativamente a ácido com vista à clivagem da unidade peptídico a partir da fase sólida, mesmo mais preferencialmente, é uma fase sólida lábil relativamente a ácido geradora de amida. Tais fases sólidas lábeis relativamente ácido requerem pelo menos 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA), mais preferencialmente pelo menos 0,5 % de TFA num solvente polar aprótico para clivagem a partir da resina. Mais preferencialmente, a fase sólida é uma fase sólida sensível a ácido que é clivada sob condições fracamente acídicas, isto é 0,1 até 10 % de TFA no referido solvente é suficiente para efectivar pelo menos 90 % de eficiência de clivagem por incubação à temperatura ambiente até 5 horas. Tais fases sólidas altamente lábeis a ácido são *e.g.* resinas de 2-clorotritilo, resina de Sieber, resina de PAL ou resina de ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butírico (HMPB), Sieber e Rink originado péptidos C-terminalmente amidados por acidólise. Tais fases sólidas lábeis a ácido são particularmente vulneráveis a químicas de desprotecção sobre resina para grupos de protecção de cadeia lateral e portanto nestes casos tem que ser tomada atenção particular.

No caso de ancoragem de cadeia lateral através de resíduo de cisteína C-terminal ao grupo de suporte de um suporte sólido, a ligação ligante tem que ser uma ligação tioéter ou tioéster. Os resíduos adequados adicionais para ancoragem de cadeia lateral são grupos carboxi de cadeias laterais acídicas, grupos hidroxí e em particular o grupo α -amino de lisina. É necessário referir que no caso de ancoragem de cadeia lateral, geralmente o grupo carboxi C-terminal livre deve ser protegido por esterificação ou amidação antes de levar a cabo a primeira reacção de Acoplamento, e.g. por utilização de Fmoc-Lys-carboxamida para reacção de ligação da função amino da cadeia lateral à fase sólida.

Numa concretização preferida, a cisteína protegida por S-*terc*-butilsulfenilo é o resíduo C-terminal do péptido e está ligada através da terminação carboxi por uma ligação éster ou amida à fase sólida, com a condição de que, a referida ligação ligante não seja uma unidade de éster benzílico mas seja preferencialmente uma resina lábil a ácido que é clivada sob condições reaccionais fracamente acídicas como definido acima. Uma cisteína C-terminal é particularmente propensa a ser sujeita a racemização em condições acídicas.

Foi descrita a remoção de grupos protectores de S-*terc*-butilsulfenilo da cisteína através de reacção com fosfinas terciárias, por exemplo através da utilização de tributílfosfina (Atherton *et al.*, 1985, J. Chem. Soc., Perkin I. 2057) e trietilfosfina (Huang *et al.*, 1997, Int. J. Pept. Protein Res. 48, 290). O mesmo passo de desprotecção é, de acordo com a presente invenção, empregue para clivar a ligação dissulfureto da N α -3-[(2-carboxietil)-ditio])propionamida, seus homólogos possuindo

um número diferente de grupos metileno ou do composto de fórmula IV. O grupo *terc*-butilsulfenilo é mais frequentemente clivado através de reagentes de tiol tais como *e.g.* R-mercaptoetanol ou ditionotreitól (DTT) ou fosfinas terciárias (Huang *et al.*, 1997 *Int. J. Pept. Protein Res.* 48, 290; Rietmann *et al.*, 1985, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1141). Preferencialmente, a fosfina terciária é trifenilfosfina ou é uma trifenilfosfina alquilada ou alcoxilada, tal como *e.g.* tri-(*p*-metoxifenil)-fosfina ou mesmo mais preferencialmente é uma trialkilfosfina em que o alquilo poderá ser o mesmo ou diferente, e em que cada alquilo é um C1 até C7 alquilo, preferencialmente C1 até C4, e poderá ser alquilo ramificado ou linear. Preferencialmente, o alquilo é linear. Exemplos são metilo, etilo, propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo. A tri-*n*-butilfosfina e a trietilfosfina são particularmente preferidas. O alquilo poderá opcionalmente ser adicionalmente substituído com halogéneo, metoxi ou etoxi ou, se receptivo ao sistema solvente, carboxi, ou é, preferencialmente, não substituído. Surpreendentemente, de acordo com a presente invenção, foi inesperadamente descoberto que a clivagem de dissulfureto através de fosfinas poderá também ser utilizada com resinas muito lábeis a ácido cliváveis em condições reaccionais fracamente acídicas tais como resina de Sieber ou 2-CTC, por exemplo. É frequentemente negligenciado que os reagentes de tiol reduzem e consequentemente clivam dissulfuretos por formação de produtos dissulfureto deles próprios.

Enquanto que no caso de DTT, é favorecido o fecho do anel intramolecular, no caso de β -mercaptoetanol, qualquer produto reaccional intramolecular, *e.g.* através de reacção

de permuta de dissulfureto, é plausível. Consequentemente, mesmo dissulfuretos recém formados poderão sofrer reacção de permuta adicional. A utilização difundida de reagentes de tiol deve-se aparentemente ao receio de reacções secundárias tais como e.g. fugas a partir da resina quando se utilizam reagentes de fosfina terciária.

Os reagentes de acoplamento para a síntese de péptidos são bem conhecidos na técnica (ver Bodanszky, M., Principles of Peptide Synthesis, 2nd ed. Springer Verlag Berlin/Heidelberg, 1993; ver aí também a discussão do papel de aditivos ou auxiliares de acoplamento). Os reagentes de acoplamento poderão ser anidridos mistos (e.g. T3P: anidrido propano fosfónico) ou outros agentes acilantes tais como ésteres activados ou halogenetos ácidos (e.g. ICBF, isobutilcloroformato), ou poderão ser carbodiimidas (e.g. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), derivados de benzotriazina activados (DEPBT: 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona) ou derivados de sal de urónio ou fosfónio de benzotriazole.

Com vista ao melhor rendimento, tempo de reacção curto de protecção contra racemização durante o alongamento da cadeia, é mais preferido que o reagente de acoplamento seja seleccionado a partir do grupo consistindo de sais de urónio e sais de fosfónio do benzotriazole capazes de activar uma função ácido carboxílico livre juntamente com o facto de a reacção ser levada a cabo na presença de uma base. Exemplos adequados e igualmente preferidos de tais sais de acoplamento de urónio ou fosfónio são e.g.

HBTU (hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio), BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris (dimetilamino)fosfónio), PyBOP

(hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-
tripirrolidino-fosfônio), PyAOP, HCTU (hexafluorofosfato de
O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio),
TCTU (tetrafluoroborato de O-1H-6-clorobenzotriazole-1-il)-
1,1,3,3-tetrametilurônio), HATU (hexafluorofosfato de O-(7-
azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio), TATU
(tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-
tetrametilurônio), TOTU (tetrafluoroborato de O-
[ciano(etoxicarbonil)metilenoamino]-N,N,N',N'-
tetrametilurônio), HAPyU (hexafluorofosfato de O-
(benzotriazol-1-il)oxidipirrolidinourônio).

Preferencialmente, quando se utiliza DEPBT ou semelhantes,
reagentes de sal de urônio ou fosfônio, é necessário um
segundo reagente base fraca ou adicional para levar a cabo
o passo de acoplamento. Isto é satisfeito por uma base cujo
ácido conjugado possui um valor de pKa de desde pKa 7,5 até
15, mais preferencialmente de desde pKa 7,5 até 10, com a
exclusão de uma função α -amino de um péptido ou aminoácido
ou derivado de aminoácido, e cuja base preferencialmente é
uma amina terciária, estereoquimicamente impedida. Exemplos
de tais e adicionalmente preferidas são a base de Hünig
(N,N-diisopropiletilamina), N,N-dialquilanilina, 2,4,6-
trialquilpiridina ou N-alquilmorfolina com o alquilo sendo
C1-C4 alquilo linear ou ramificado, mais preferencialmente
é N-metilmorfolina ou colidina (2,4,6-trimetilpiridina),
mais preferencialmente é colidina. Exemplos de C1-C4
alquilo são e.g. metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, n-
butilo, *terc*-butilo, isobutilo.

A utilização de aditivos de acoplamento, em particular de
aditivos de acoplamento do tipo benzotriazole, é também
conhecida (ver Bodanszky, *supra*). A sua utilização é

particularmente preferida quando se utilizam os reagentes de acoplamento de sal de urónio ou fosfónio mencionados acima, altamente activadores. Portanto, é adicionalmente preferido que o aditivo de reagente de acoplamento seja um composto capaz de formar ésteres activados, mais preferencialmente possuindo uma função acídica N-hidroxi nucleófila em que N é imida ou é triazeno substituído por N-acilo ou N-arilo, mais preferencialmente o aditivo de acoplamento é um derivado de N-hidroxibenzotriazole (ou um derivado de 1-hidroxi-benzotriazole) ou é um derivado de N-hidroxibenzotriazina. Tais compostos N-hidroxo aditivos de acoplamento foram descritos amplamente em WO 94/07910 e EP-410 182 e a sua descrição é dada como integralmente incorporada por citação. Exemplos são e.g. N-hidroxissuccinimida, N-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOOBt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt) e N-hidroxibenzotriazole (HOBt). Os derivados de N-hidroxibenzotriazina são particularmente preferidos, numa concretização mais preferida, o aditivo de reagente de acoplamento é hidrox-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina. Os compostos de sais de amónio de aditivos de acoplamento são conhecidos e sua utilização na química de acoplamento foi descrita, por exemplo em US 4806641.

Numa concretização adicional particularmente preferida, o reagente de acoplamento de sal de urónio ou fosfónio é um reagente de sal de urónio, preferencialmente é HCTU, TCTU ou HBTU, mais preferencialmente é HCTU ou TCTU, e mais preferencialmente é utilizado na reacção em combinação com N-hidroxi 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina ou um seu sal. Esta concretização é principalmente preferida para utilizar no passo de elongação da cadeia da síntese de péptido após remoção do grupo protector de $N\alpha$ lábil

relativamente à base, mas poderá ser utilizado para reacção de lactamização durante a ciclização da cadeia lateral.

No contexto da presente invenção, deve ser observado que HCTU e TCTU são definidos de modo a serem englobados pelo termo 'reagente de sal de urónio' apesar de estes compostos e análogos possíveis terem demonstrado compreender uma unidade isonitroso em vez de uma unidade urónio através de análise da sua estrutura cristalina (O. Marder, Y. Shvo, and F. Albericio "HCTU and TCTU: New Coupling Reagents: Development and Industrial Applications". Apresentação em Painel, na Conferência Gordon em Fevereiro de 2002), um substituinte N-amidino no núcleo heterocíclico originando, em vez disso, a uma estrutura de guanídio. No contexto presente, tal classe de compostos é denominada 'subclasse tipo guanídio' do reagente de sal de urónio de acordo com a presente invenção.

A desprotecção do $N\alpha$ lábil relativamente à base poderá ser levada a cabo como efectuado rotineiramente na técnica, e.g. com piperidina a 20 % em N-metilmorfolina no caso da química de Fmoc. Mais amplamente, a química de protecção de Fmoc ou Boc para a extremidade N é aplicada rotineiramente em síntese de fase sólida mas químicas adicionais opcionais de protecção a $N\alpha$ são conhecidas na técnica e podem ser aplicadas quando não interferirem com a presente invenção para proteger a ciclização de péptido associado a dissulfureto do péptido conjugado com a resina.

A química de acoplamento acima mencionada pode também ser empregue para acoplamento do composto de fórmula IV, $R_7-S-S-[CH_2]_2-COOH$ como definido acima. Este composto pode ser

produzido facilmente e.g. pela reacção da dicarboximida simétrica respectiva e.g. com um alcanol ou alquilamina.

A ciclização é levada a cabo de acordo com a presente invenção na presença de uma primeira base fraca num solvente orgânico polar, aprótico. O reagente de oxidação que medeia a ciclização poderá ser qualquer um mencionado em Chan and White, eds., 'Fmoc Solid-phase Peptide Synthesis', Oxford University Press 2000, p. 91 a 114: glutationa em tampão aquoso, DMSO, ferrocianeto de potássio, reagente de Ellman, 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), iodeto, trifluoroacetato de tálio(III), alquiltriclorossilano-sulfóxido, oxidação mediada por trifluorometanossulfonato de prata-DMSO em meio fortemente ácido onde não sendo completamente impraticável para utilização na ciclização sobre resina num sistema de solvente ainda mais orgânico para a solvatação do péptido protegido tal como é a oxidação mediada por carvão vegetal. Outro método geral é a utilização do cloreto de carboetoxisulfenilo para a formação da ligação dissulfureto (Le-Nguyen, D., 1986, Int. J. Péptido Protein Res. 27, 285-292). Devido ao sistema de solvente, numa concretização preferida a ciclização é levada a cabo através de oxidação mediada por DMSO como descrito e.g. em US 5144006 em mais detalhe, tornando o DMSO quer um oxidante e um co-solvente miscível em adição aos solventes mencionados abaixo, eventualmente na presença de pequenas quantidades de água. O DMSO providencia aceitavelmente taxas reacionais rápidas, é um co-solvente desnaturante e ajuda a solubilizar o substrato péptido. Dado o seu efeito oxidante nas cadeias laterais de metionina, a sua utilização na ciclização sobre resina, antes da desprotecção das cadeias

laterais de aminoácidos, é muito mais conveniente que sua normal utilização em solução com péptidos desprotegidos.

Numa concretização mais preferida a referida ciclização é levada a cabo na presença de ar e/ou oxigénio mas notavelmente na ausência de um catalisador heterogéneo acelerador da velocidade, para se conseguir a oxidação de grupos tiol de modo a formar ligações dissulfureto. Preferencialmente, a ciclização é levada a cabo substancialmente livre de catalisador, isto é na ausência de uma quantidade cataliticamente efectiva ou substancial de um catalisador heterogéneo.

De acordo com a presente invenção e em particular quando sendo levada a cabo com ar e/ou oxigénio como o reagente oxidante, mais preferencialmente com ar/oxigénio na ausência do referido catalisador heterogéneo ou de fase sólida, o passo de ciclização de acordo com o método presente é notavelmente eficiente e requer só cerca de 0,5 a 2 horas de tempo reaccional, permitindo literalmente a completa conversão quantitativa do reagente no produto desejado sob condições reacionais muito suaves (tipicamente temperatura ambiente, conveniente intervalo de temperatura sendo de 10 °C a 80 °C embora a temperatura de refluxo do solvente, tenha evidentemente que ser tomada em consideração). Sem precedentes, ainda assim a conversão é completa. Isto é uma conquista notável e não tinha ainda sido conseguida na ciclização conduzida da ligação de dissulfureto com o péptido, nem tais condições reacionais de ciclização simples, rápidas e suaves tinham sido delineadas anteriormente. Nunca surgiram quaisquer problemas de separação e de mistura tediosa para um catalisador heterogéneo. Ainda, a velocidade reaccional

compara-se completamente com aquela da reacção conduzida por catalisador da técnica antecedente. Devido ao curso directo da reacção, a formação de produtos secundários é evitada quase inteiramente.

Os solventes polares apróticos adequados são e.g. acetonitrilo, dimetilformamida, diclorometano, N-metilpirrolidona, tetrahidrofurano. Em contraste com a água, tais solventes usualmente poderão não dissolver fisicamente quantidades relevantes de oxigénio para providenciar a formação oxidativa de ligações de dissulfureto como foi descrito anteriormente para sistemas de catalisadores aquosos.

Concordantemente, deve ser dada atenção ao fornecimento de ar, ar/oxigénio ou oxigénio puro. O ar/oxigénio poderá ser fornecido através de agitação, por vórtice, concepção especial de propulsores para agitação, pulverização de gás no líquido. O gás poderá ser ar ou oxigénio puro ou ar enriquecido com oxigénio. Numa concretização particularmente preferida, vastas áreas superficiais do fundo e/ou paredes do recipiente reaccional são perfuradas de modo a pulverizar o gás no líquido, sob agitação cuidadosa.

É também possível que sejam utilizados modos de protecção diferentes para cisteínas sobre um péptido da presente invenção. Por exemplo, cisteínas adicionais na cadeia de péptido poderão ser protegidas tradicionalmente por grupos de protecção Acm, ao providenciar uma ligação de dissulfureto regioespecífica adicional entre cisteínas internas por meio de oxidação de iodo padrão em solução após clivagem da resina, e após ligação de dissulfureto

inicial de acordo com a presente invenção ter ocorrido sobre a resina.

O primeiro reagente base fraca é uma base fraca cujo ácido conjugado tem um valor de pKa de desde 7,5 a 15, mais preferencialmente de desde pKa 8 a 10, preferencialmente, é uma amina terciária impedida estereoquimicamente. Exemplos de tais e de preferidas adicionais são a base de Hünig (N,N-diisopropiletilamina), N,N-dialquilanilina, 2,4,6-trialquilpiridina ou N-alquil-morfolina com o alquilo sendo C₁-C₄ alquilo linear ou ramificado tal como metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, mais preferencialmente é N-metilmorfolina, colidina (2,4,6-trimetilpiridina) ou uma base de Hünig.

Preferencialmente a remoção prévia de grupos protectores de dissulfureto, notavelmente a remoção do grupo S-terc-butil-sulfenilo, é efectuada na presença de um primeiro reagente de base fraca para evitar qualquer risco de perda a partir da resina por uma pequena acidólise, que é a um pH de desde 7,5 a 12, mais preferencialmente de desde 8 a 11. Opcionalmente, através da utilização de solventes polares apróticos tal como THF ou acetonitrilo que são livremente miscíveis com água, poderiam ser utilizados sais básicos tal como e.g. acetato de sódio em solução aquosa para aquele propósito. Esta concretização é particularmente preferida quando se utilizam fosfinas terciárias para a referida quebra do grupo dissulfureto ou passo de remoção. Por combinação do fornecimento adequado de oxigénio concomitante com tal remoção do grupo de protecção de dissulfureto, poderá ser possível noutra concretização da presente invenção, e.g. quando se utiliza um solvente orgânico polar aprótico juntamente com o fornecimento de

oxigénio na presença de uma amina terciária e quando se utiliza uma fosfina terciária para desprotecção que seja inerte ao oxigénio, para levar a cabo ambas, desprotecção e ciclização de dissulfureto não apenas numa reacção de recipiente único mas até como um passo reaccional único.

Uma vez que o método presente permite a ciclização sobre resina, não requer diluição tediosa e com forte diminuição do rendimento de péptido para favorecer a ciclização intra-sobre a intermolecular como requerido previamente em muitos métodos descritos na técnica antecedente.

O modo de operação sobre resina da invenção permite apenas a rápida e eficiente ciclização intra-molecular, não dando oportunidade a qualquer dimerização.

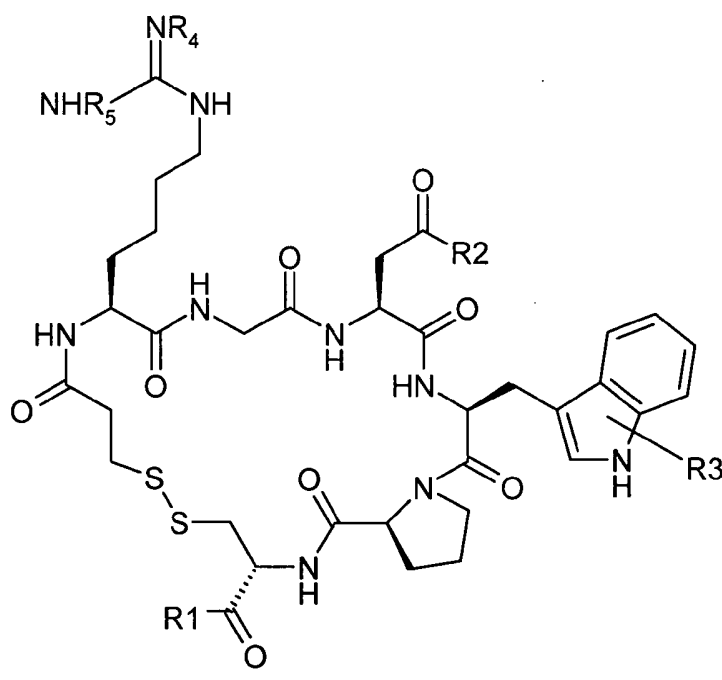
Numa concretização preferida adicional, o péptido é o péptido de fórmula I. O termo grupo protector é para ser considerado como sendo um grupo protector para uma dada funcionalidade da cadeia lateral ou cadeia lateral específica cujo grupo protector é compatível com o facto de ser utilizado na síntese comum de péptido de fase sólida com *terc*-butoxicarbonilo (Boc) ou 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Tais grupos protectores e a utilização de grupos protectores específicos para funcionalidades específicas de cadeia lateral são bem conhecidos na técnica e são de rotina (s. Chan *et al.*, *ed.*, *supra*; Bodanszky *et al.* *supra*).

Numa possível concretização adicional, o péptido é sintetizado opcionalmente numa fase sólida não por ligação covalente permanente da unidade peptídilo a uma fase sólida mas por ligação reversível não covalente à fase sólida por

meio de um complexo quelato metálico estável (produto novo conjuntamente de Lonza AG, Basel, Switzerland e AplaGen GmbH, Baesweiler, Germany, Outubro de 2004), semelhante à tecnologia dos marcadores hexa-His estabelecida na purificação de proteínas. Tal ligação em fase sólida não covalente ou semelhante, as concretizações futuras são englobadas pela presente invenção bem como o modo preferido de operação da presente invenção mencionado acima e adiante se aplica igualmente a esta concretização.

Os péptidos favoravelmente ciclizados, conjugados em fase sólida como descrito anteriormente, e suas combinações com as concretizações preferidas citadas acima e adiante, são objectivos adicionais da presente invenção.

Um primeiro objectivo é um péptido de fórmula I



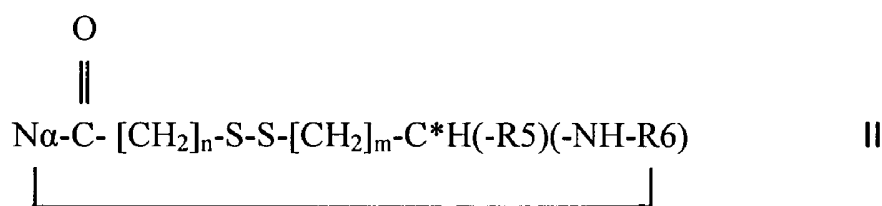
em que R₄, R₅ são H ou um grupo protector de Arg, R₂ é um grupo protector de ácido carboxílico e R₃ é um grupo

protector de Trp e R1 é uma fase sólida com um tioéster, éster ou ligante de ligação a amida, à cadeia principal do péptido.

Preferencialmente, em tal péptido R4, R5 são H e R3 é N-benziloxicarbonilo e R2 é *terc*-butilo.

Preferencialmente, a referida fase sólida é uma resina ou outra resina que compreenda um ligante ou sítio de suporte gerador de amida que é consequentemente um ligante de ligação à cadeia principal do péptido.

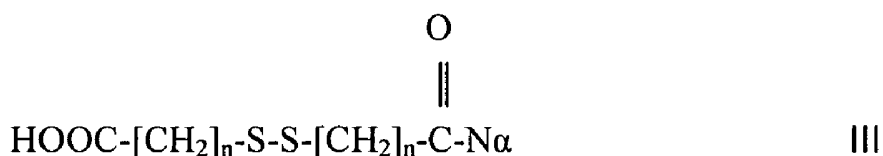
Um segundo objectivo é um péptido, preferencialmente um péptido compreendendo pelo menos um grupo protector da cadeia lateral de aminoácido, em que o péptido está ligado a fase sólida através do resíduo C-terminal ou através de uma cadeia lateral de aminoácido, caracterizado em que o péptido é um péptido cíclico compreendendo uma unidade de fórmula II



em que n, m são independentemente seleccionados a partir do intervalo de 1 a 10, preferencialmente n é 2 e m é 1 (originando uma unidade cisteinilo), N α é o azoto N-terminal da cadeia principal do péptido e C* é o C α de um resíduo de aminoácido da cadeia principal do péptido, com R6 sendo a metade cíclica N-terminal da cadeia principal péptido que termina com o referido N α e sendo R5 a metade C-terminal da cadeia principal péptido que está ligada à

fase sólida, com a condição de que N não seja N α , e preferencialmente em que R6 compreende pelo menos 3, mais preferencialmente pelo menos 4 resíduos de aminoácido intervenientes. Por razões de clareza, R5 é para ser considerado como uma quantidade para C*H(-CO-NH-R') ou C*H(-CO-O-R') ou eventualmente C*H(-CO-S-R'), compreendendo R' uma fase sólida incluindo possivelmente um ligante ou sítio de suporte, R5 é opcionalmente um número de resíduos de aminoácido ligados à referida fase sólida. Preferencialmente, R5 e R6 compreendem até 200, mais preferencialmente até 100, mais preferencialmente até 50 resíduos de aminoácido.

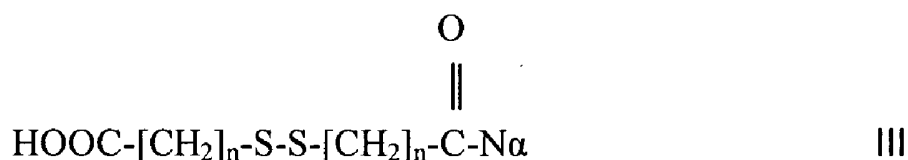
Um objectivo adicional é um péptido, preferencialmente um péptido compreendendo pelo menos um grupo protector de cadeia lateral de aminoácido diferente de um grupo de S-*terc*-butilsulfenilo sobre um resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína, cujo péptido está ligado à fase sólida através do resíduo C-terminal, caracterizado em que o péptido compreende pelo menos uma cisteína, resíduo de homo- ou nor-cisteína que está protegido na sua cadeia lateral pelo grupo S-*terc*-butilsulfenilo e que é substituído terminalmente em N no seu N α para constituir a unidade amida da fórmula III



em que n é 1 a 10, preferencialmente n é 2.

Novamente um objectivo adicional é um péptido, preferencialmente um péptido compreendendo pelo menos um

grupo protector de cadeia lateral de aminoácido diferente do grupo S-*terc*-butilsulfenilo sobre um resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína, cujo péptido está ligado à fase sólida através de um resíduo C-terminal, caracterizado em que o péptido compreende pelo menos um resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína que possui um grupo tiol livre na sua cadeia lateral e que é substituído terminalmente em N no seu N α para constituir a unidade amida de fórmula III



em que n é 1 a 10, preferencialmente n é 2.

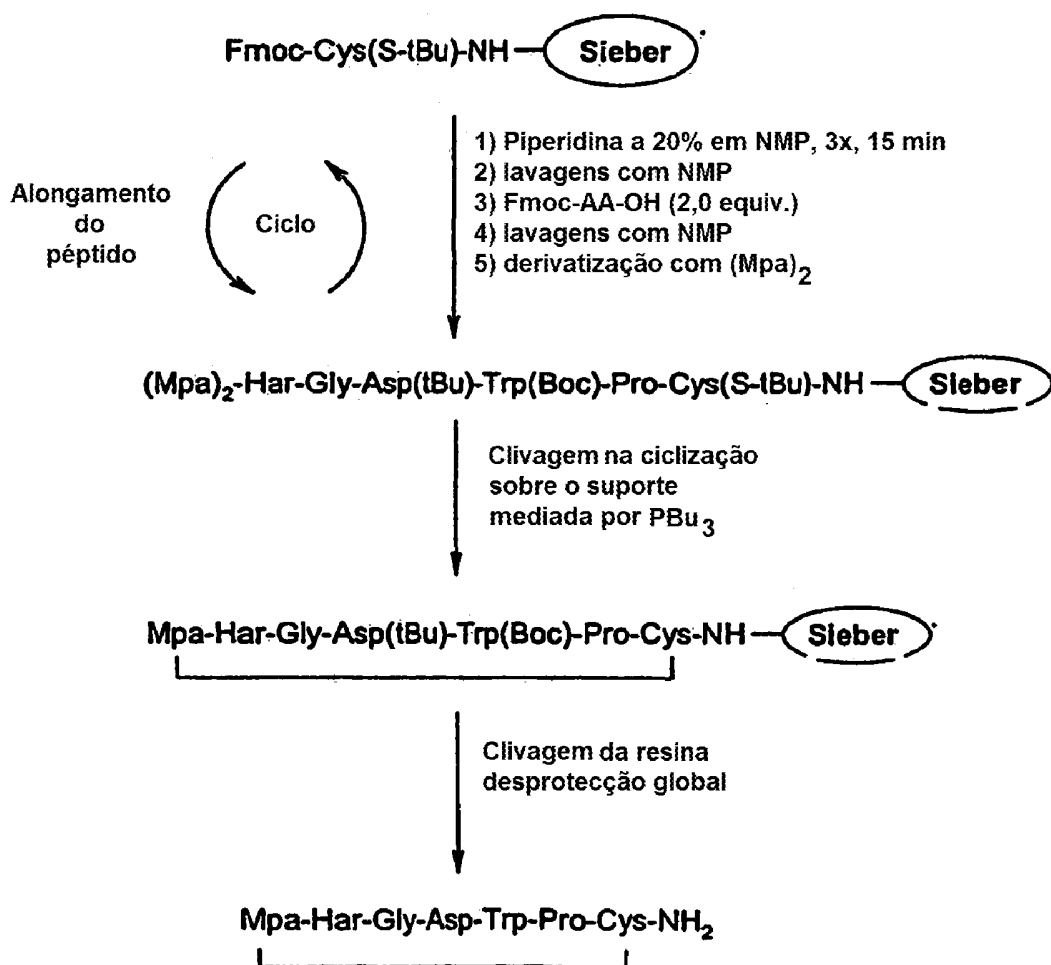
Igualmente, os referidos péptidos do último e segundo objectivo da presente invenção de novo compreendem preferencialmente até 200, mais preferencialmente até 100, mais preferencialmente até 50 resíduos de aminoácido. É necessário referir que a escolha da resina também terá impacto no rendimento obtido quando se sintetizam péptidos muito longos, sendo até um pré-requisito para sintetizar péptidos de 100 ou mais resíduos de aminoácido. As resinas PEG por exemplo, poderão ser usualmente uma boa escolha para tal. Adicionalmente é necessário referir que a sequência individual de aminoácidos do péptido poderá bem influenciar o cumprimento máximo da cadeia e a eficiência do acoplamento obteníveis com um dado péptido; exemplo amplamente conhecido é a agregação desfavorável entre cadeias de sinais de péptidos durante a síntese linear devido à formação da folha beta e ligação inter-cadeia.

Ensaaios

A eptifibatida foi seleccionada como um modelo de péptido protegido para ciclização sobre resina, objectivando vislumbrar o método novo melhorado da presente invenção; um método de síntese em fase sólida para eptifibatida foi descrito antes em US 5 318 899.

A estratégia de síntese global é apresentada na tabela I abaixo:

Tabela I



1.1 Fmoc SPPS de péptido linear Gly-Asp(tBu)-Trp(Boc)-Pro-Cys(S-tBu)-Sieber

A síntese de Fmoc-Cys(S-tBu)-OH foi descrita anteriormente (Rietman *et al.*, 1994, *Synth. Commun* v24, p. 1323 f). A resina Sieber foi um produto da Novabiochem e foi adquirida à Calbiochem-Novabiochem (pertencente a EMD Biosciences, California/U.S.A.). Todos os aminoácidos Fmoc, incluindo Fmoc-Cys(S-tBu)-OH (cat. No. B-1530) foram adquiridos à Bachem AG (Bubendorf, Switzerland).

O carregamento da resina foi a 0,52 mmol/g and de um total de 10 g de resina Sieber. O tempo de acoplamento para carregamento foi duas vezes o tempo de acoplamento padrão, nomeadamente 60 min. no total. Os acoplamentos foram conduzidos com 2 eq. cada do respectivo aminoácido na presença de 1 eq. cada de 6-cloro-HOBt, TCTU, base de Hünig (diisopropiletilamina), em diclorometano. As lavagens foram com N-metilpirrolidona (NMP).

A desprotecção de Fmoc foi feita em 3 ciclos de 15 min. com piperidina a 10 % em N-metilpirrolidona; a eficiência da clivagem e a conclusão da síntese foi analisada por reacção de ninidrina e HPLC em fase reversa, respectivamente.

1.2 Elongação do péptido a partir de 1.1 para Har-Gly-Asp(tBu)-Try(Boc)-Pro-Cys(S-tBu)-Sieber

O acoplamento do resíduo de Fmoc-Har (Bachem, Bubendorf, Switzerland) realizou-se na presença de 1 eq. de HOBt por eq. de aminoácido (para se manter o grupo guanidino protonado); o aminoácido Fmoc foi pré-incubado com HOBt e 1 eq. de diisopropilcarbodiimida em NMP e foi seguidamente

misturado com a resina. O acoplamento de Har levou 180 min. (outros aa: 30 min.) seguido por um segundo ciclo de cerca de 60 min com reabastecimento dos reagentes. Deste modo, poder-se-ia atingir uma eficiência de acoplamento padrão de 99,8%, tal como para outros resíduos. A clivagem de Fmoc ocorreu como anteriormente. Notavelmente, após a clivagem de Fmoc e subseqüentes lavagens com NMP, foram feitas lavagens repetidas com HOBt para prevenir o inchamento adicional da resina.

Observação: o acoplamento prolongado utilizando TCTU é também praticável para acoplamento de Arg utilizando outros grupos de protecção diferentes dos acima de emparelhamento de iões com HOBt. O emparelhamento de iões com HOBt adicional é uma concretização preferida quando comparada com a utilização de química de protecção covalentemente acoplada para Arg, tal como e.g. Pbf, que poderá ser problemática no que diz respeito a reacções secundárias durante a desprotecção.

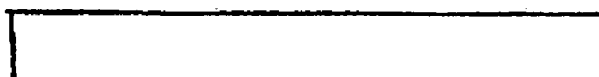
1.3 Derivatização da resina-péptido a partir de 1.2 para (Mpa)2-Har-Gly-Asy(tBu)-Tm (Boc)-Pro-Cys(S-tBu)-Sieber

A reacção com 3,3'-ditiopropionimida (Novabiochem) realizou-se em DMF arrefecido a menos de 10 °C num banho de gelo. Foi adicionado um 1 eq. de diisopropilcarbodiimida à mistura reaccional durante 10 min. com agitação, enquanto se controlou a temperatura para permanecer abaixo de 15-20 °C. Em seguida, a mistura reaccional foi adicionada ao produto de péptido ligado à resina desprotegido da secção 1.2. Foi deixado prosseguir o acoplamento durante 6 horas à temperatura ambiente.

Alíquotas do produto reaccional foram clivadas da resina com TFA a 60 % e analisadas por LC-(electropulverização) MS. A conversão foi quantitativa, embora tenham sido detectados dois picos principais de produtos (< 25 % de produto secundário: dipéptido). Consequentemente o rendimento para este passo foi > 75 %.

1.4 Desprotecção com Bu₃P

A resina foi suspensa e lavada três vezes em tetrahidrofurano (THF). A reacção foi levada a cabo durante 1 h à temperatura ambiente com 50 eq. de tributilfosfina preparada como PBu₃ a 19 % (v/v)/ THF a 77 % (v/v)/ uma solução aquosa de acetato de sódio a 4 % (v/v); o sal de precipitação foi removido por filtração antes da utilização. A reacção prosseguiu uniformemente para originar um pico do produto dominante. O rendimento foi determinado por HPLC em fase reversa e foi verificado ser 98,9 % do produto puro.



1.5 Ciclização para originar Mpa-Har-Gly-Asp(tBu)-Trp(Boc)-Pro-Cys-Sieber

O conjugado péptido-resina a partir de 1.4 foi lavado inchado e lavado três vezes em NMP. A ciclização foi efectuada por incubação da resina durante 1 h à temperatura ambiente com DIEA a 6 % (base de Hünig) em NMP; a reacção foi levada a cabo num recipiente de vidro vertical que compreendeu um vidro calcinado dividido horizontalmente, vedado em G3 (16-40 µm) na sua porção inferior. O vidro calcinado ou placa calcinada foi ventilado com ar por baixo, permitindo borbulhar ar através de toda a secção

transversal do espaço reagente coberto de solvente acima do calcinado no qual a resina estava flutuando por acção do ar que borbulha por baixo. Um produto uniforme, estritamente puro é obtido, sem aparecimento de subprodutos distintos ou quebradiços após este passo reaccional. A conversão do produto foi de 100 %, como determinado independentemente por ambas, HPLC em fase reversa e LC-MS. A RP-HPLC foi levada a cabo numa coluna C18 de 150 x 4,6 mm Hypersil-Keystone™ Betabasic (Thermo Electron Corp., Waltham Mass./USA.), com um volume de injeção de 15 µL e detecção a 262 nm a uma temperatura de coluna de 35 °C. O gradiente do ensaio foi

Tempo	Acetonitrilo	(TFA a 0,1%)/Água (TFA a 0,1%)
0	60	40
5	97	3
16	97	3
17	60	40

1.6 Desprotecção global

A desprotecção global foi preparada por inchamento da resina três vezes em diclorometano (DCM). A mistura de fase reaccional de clivagem foi preparada de modo a ser feita a partir de

86,5%	TFA (785 eq.)
4,5%	Tioanisole (36,5 eq.)
3%	Fenol (32,4 eq.)
3%	DCM (38 eq.)
3%	H ₂ O (178 eq.)

A reacção ocorreu a 15 °C durante 2 h num dispositivo giratório orbital de rotação lenta. A reacção terminou e o

produto foi precipitado, após remoção por filtração da resina, pela adição gota a gota do éster metílico do ácido *terc*-butírico. O produto originou um pico uniforme; nenhum produto secundário principal pôde ser detectado. As condições acima de desprotecção global foram testadas num controlo e verificou-se que não afectam pontes de dissulfureto em péptidos. A conversão neste último passo foi > 99 %, como determinado por RP-HPLC e LC-MS como enunciado em detalhe na secção 1.5 acima.

Lisboa, 13 de Abril de 2010

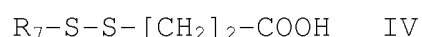
REIVINDICAÇÕES
"CICLIZAÇÃO DE PÉPTIDOS SOBRE RESINA"

1. Método de síntese de péptidos, compreendendo os passos de

a. sintetizar um péptido ligado a uma fase sólida cujo péptido compreende pelo menos um cisteína, resíduo homo- ou nor-cisteína, cuja cisteína está protegida na sua cadeia lateral por um grupo *S-terc*-butilsulfenilo, e

b. ou acoplar N-terminalmente um aminoácido adicional possuindo um radical 3-[2-carboxietil)ditio]propionilo no seu N α ou,

opcionalmente, desproteger o N α do aminoácido N-terminal e fazer reagir o N α com 3,3'-ditiopropionimida para originar a N α -3-[(2-carboxietil)-ditio]propionamida correspondente, ou desproteger o N α do aminoácido N-terminal e fazer reagir o N α livre com um composto de fórmula IV



em que R₇ é aril- , incluindo heteroaril-, ou é aralquil-, alquilaril- ou alquil- o qual poderá ser adicionalmente substituído com halogéneo, amido, éster e/ou éter, e

c. fazer reagir adicionalmente os péptidos com um reagente removedor de grupo protector *S-terc*-butilsulfenilo, preferencialmente fazendo reagir os péptidos com uma trifenil- ou trialquilfosfina substituída ou não substituída, e

d. ciclizar os péptidos através da formação da ligação dissulfureto entre, formalmente, a cisteína e a unidade 3-tiopropionamida no Na, na presença de ar e/ou oxigénio.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a referida cisteína possuir pelo menos 3, mais preferencialmente pelo menos 5 resíduos de aminoácidos espaçados para além do resíduo de aminoácido N-terminal do referido péptido.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a resina de fase sólida ser seleccionada a partir de 2-clorotritilo (CTC) ou uma resina produtora de amida.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o péptido possuir pelo menos um grupo protector de cadeia lateral adicional incluindo resíduos adicionais de cisteína homo- ou nor-cisteína, diferentemente protegidos.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a cisteína ser o último resíduo C-terminal.

6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 6, **caracterizado por** a remoção de pelo menos o grupo S-terc-butilsulfenilo ser conseguido pela reacção do péptido com a trialkylfosfina.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o péptido ser ciclizado na presença de uma base fraca num solvente polar, aprótico.

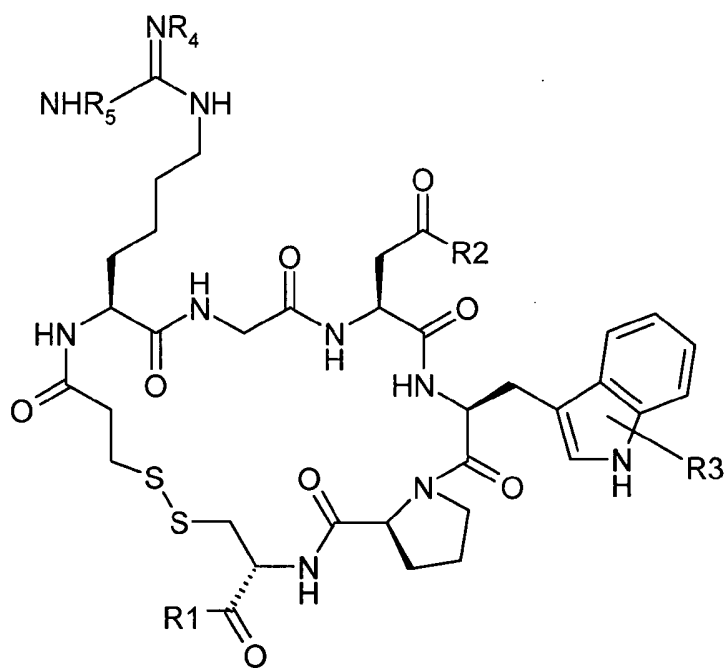
8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 7, **caracterizado por** a ligação do péptido à fase sólida ser

lável relativamente a ácido, preferencialmente lábil em TFA a 60 % em diclorometano à temperatura ambiente.

9. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** a resina ser uma resina Sieber.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** num passo subsequente, o péptido ser retirado da resina por clivagem, preferencialmente sob condições de desprotecção global.

11. Péptido de fórmula I

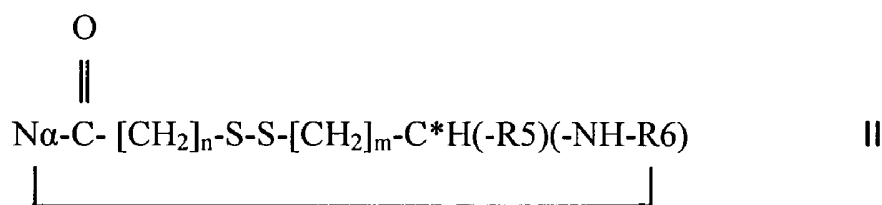


em que R₄, R₅ são H ou um grupo protector de Arg, R₂ é um grupo protector de ácido carboxílico e R₃ é um grupo protector de Trp e R₁ é uma fase sólida com um tioéster, éster ou ligante de ligação a amida, à cadeia principal do péptido.

12. Péptido de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado por** R4, R5 serem H e R3 ser N-benziloxycarbonilo e R2 ser *terc*-butilo.

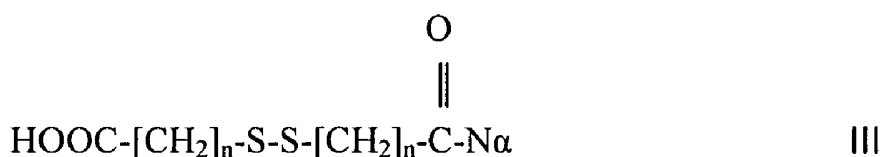
13. Péptido de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por** a fase sólida ser uma resina Sieber que está consequentemente a formar a ligação amida à cadeia principal do péptido.

14. Péptido, preferencialmente compreendendo pelo menos um grupo protector de cadeia lateral de aminoácido, em que o péptido está ligado à sólida fase através do resíduo C-terminal ou através de uma cadeia lateral de aminoácido, **caracterizado por** o péptido ser um péptido cíclico compreendendo a unidade de fórmula II



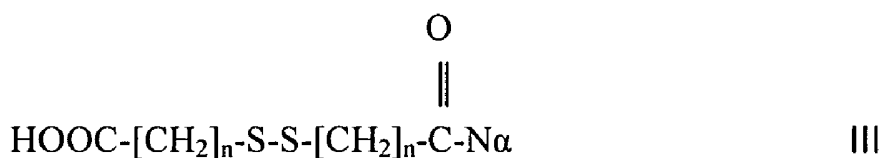
em que n, m são independentemente seleccionados a partir do intervalo de 1 a 10, N α é o azoto N-terminal da cadeia principal do péptido e C* é o C α de um resíduo de aminoácido da cadeia principal do péptido, com R6 sendo a metade cíclica N-terminal da cadeia principal péptido que termina com o referido N α e sendo R5 a metade C-terminal da cadeia principal péptido que está ligada à fase sólida, com a condição de que N não seja N α , e preferencialmente em que R6 compreende pelo menos 3, mais preferencialmente pelo menos 4 resíduos de aminoácido intervenientes.

15. Péptido, preferencialmente compreendendo pelo menos um grupo protector de cadeia lateral de aminoácido para além de um grupo *S-terc*-butilsulfenilo num resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína, cujo péptido está ligado à fase sólida através do resíduo C-terminal, **caracterizado por** o péptido compreender pelo menos um resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína que está protegido na sua cadeia lateral por um grupo *S-terc*-butilsulfenilo e que está substituído N-terminalmente no seu N α para constituir a unidade amida de



em que n é 1 a 10, preferencialmente n é 2.

16. Péptido, preferencialmente compreendendo pelo menos um grupo protector de cadeia lateral de aminoácido para além de um grupo *S-terc*-butilsulfenilo num resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína, cujo péptido está ligado à fase sólida através do resíduo C-terminal, **caracterizado por** o péptido compreender pelo menos um resíduo de cisteína, homo- ou nor-cisteína que possui um grupo tiol livre na sua cadeia lateral e que está substituído N-terminalmente no seu N α para constituir a unidade amida de fórmula III



em que n é 1 a 10, preferencialmente n é 2.

Lisboa, 13 de Abril de 2010