



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91631 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)  
C07K007/10 A A61K037/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.09.05	(73) <i>Titular(es):</i> F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., (SA. OU AG.) 124 GRENZACHERSTRASSE CH-4002 BASILEIA CH
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.09.06 US 240662	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.03.30	(72) <i>Inventor(es):</i> ARTHUR MARTIN FELIX US DAVID CHARLES FRY US EDGAR PHILIP HEIMER US VINCENT STEWART MADISON US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 11/94 1994.11.09	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GRF CÍCLICOS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRITIVA  
DA  
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 91.631

NOME: F. Hoffmann-La Roche AG., suíça, com sede em 124 Grenza-  
cherstrasse, CH-4002, Basileia, Suíça,

EPIGRAFE: "Processo para a preparação de análogos de GRF  
cíclicos"

INVENTORES: Arthur Martin Felix,  
David Charles Fry,  
Edgard Philip Heimer,  
Vincent Stewart Madison,

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

Prioridade:- U.S.A., 06.09.1988, sob o Nº 240,662,

"Processo para a preparação de  
análogos de GRF cíclicos"  
-----

Pensa-se que o crescimento dos mamíferos é regulado por uma cascata de moléculas bio-reguladoras. O hipotálamo produz uma substância designada por factor de libertação da hormona do crescimento (GRF) o qual por sua vez actua sobre a pituitária para provocar a libertação da hormona do crescimento. A pituitária é mantida sob retro-controlo negativo pela somatostina e pelo factor de crescimento da insulina (IGF). Descobriu-se que o GRF é extremamente activo e capaz de estimular a libertação no sangue da hormona do crescimento em níveis da ordem dos microgramas por ml. O GRF pode ser utilizado terapeuticamente na maior parte das áreas actualmente consideradas como objectivos para a aplicação da hormona do crescimento, por exemplo, no tratamento do nanismo pituitário e de diabetes resultantes da produção anormal da hormona do crescimento, para melhorar a cicatrização de ferimentos, para o tratamento de queimaduras, para retardar o processo de envelhecimento ou para a osteoporose ou cicatrização óssea.

O isolamento bem sucedido do GRF ficou a dever-se parcialmente à descoberta de que os tumores pancreáticos associados com acromegalia produziam ectopicamente grandes quantidades de GRF. Fez-se o isolamento de três formas de GRF com sequências homólogas de aminoácidos mas de comprimentos diferentes (44, 40 e 37 aminoácidos).

A forma amidada de GRF com o comprimento de 44 aminoácidos é considerada como sendo a molécula original. Produziu-se uma grande variedade de análogos sintéticos. São constituídos por polipeptidos que possuem uma sequência de aminoácidos equivalente à do GRF originalmente isolado ou de fragmentos biologicamente activos de análogos seus com diversas substituições de aminoácidos. As alterações foram concebidas especificamente para proporcionar com frequência análogos sintéticos com propriedades biológicas superiores às da molécula original. Em consequência, o objectivo consiste em conceber análogos de GRF que exibam actividade biológica máxima por exemplo em termos de potência, eficácia e estabilidade.

Até ao momento presente, todos os análogos conhecidos de GRF possuem configuração linear. De um modo geral os péptidos lineares são moléculas muito flexíveis e falta-lhes uma conformação bem definida. Num péptido linear cada aminoácido está exposto ao meio circundante resultando daí uma maior susceptibilidade à degradação enzimática e química.

Um tipo de péptido cíclico (lactama) pode ser um péptido em que o grupo carboxilo de cadeia lateral de um aminoácido ácido (por exemplo Asp ou Glu) está ligado ao grupo amino de cadeia lateral de um aminoácido básico (por exemplo Lys) através da geração de uma ligação amida.

As propriedades biológicas dos péptidos cíclicos estão frequentemente alteradas em relação às dos seus análogos lineares. Os péptidos cíclicos são muito mais rígidos, com formas bem definidas e com resíduos de aminoácidos interiores que estão protegidos do meios circundante. Estas modificações

1  
T.

reflectem-se nas propriedades biológicas do péptido. A duração de acção do péptido cíclico pode ser mais longa, uma vez que a estrutura compacta o torna menos susceptível de degradação química e enzimática. A biodisponibilidade do péptido cíclico pode ser aumentada devido a modificações na distribuição tecidual provocada pelos resíduos de aminoácidos interiores protegidos. Além disso, a conformação bem definida do péptido cíclico proporcionará uma especificidade maior para o receptor alvo, reduzindo assim a probabilidade de existirem efeitos secundários biológicos indesejáveis. Em contraste com os péptidos cíclicos, existem geralmente receptores centrais e periféricos para um determinado péptido linear, podendo existir considerável reactividade cruzada de um dado péptido com receptores para outro péptido.

A presente invenção diz respeito a análogos lineares e cíclicos de GRF das sequências de aminoácidos específicas adiante descritos, bem como aos seus sais farmacologicamente aceitáveis.

A presente invenção diz também respeito a um método para estimular a libertação da hormona do crescimento num paciente, por administração a esse paciente de uma quantidade eficaz dos compostos da presente invenção.

Os símbolos que se seguem e a terminologia utilizados na memória descritiva têm significados a seguir definidos:

1. péptido cíclico ou lactama : significa um péptido em que o grupo carboxilo da cadeia lateral de um aminoácido ácido (por









4.

N-metil-L-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

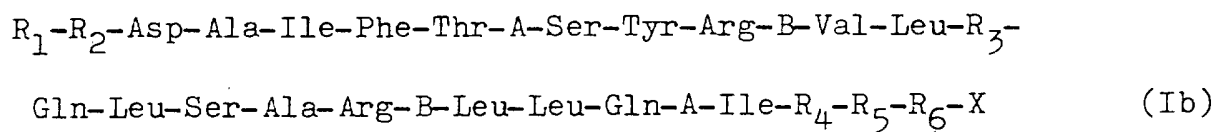
Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

desNH<sub>2</sub>-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

desNH<sub>2</sub>-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub> e

N-metil-L-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>.

A segunda versão preferida dos péptidos de fórmula geral I abrange os compostos com ciclizações nas posições 8,12 e 21,25 proporcionando péptidos cíclicos de fórmula geral



São preferidos os péptidos de fórmula geral I (b) na qual

R<sub>1</sub> = Tyr, desNH<sub>2</sub>-Tyr, N-metil-L-Tyr; R<sub>2</sub> = Ala ou D-Ala; R<sub>3</sub> = Ala; e X = NH<sub>2</sub>.

São ainda preferidos os péptidos de fórmula geral I (b)

4.

na qual A na posição 8 representa Asp e B na posição 12 representa Lys e B na posição 21 representa Lys e A na posição 25 representa Asp;  $R_4 = \text{Met}$ ;  $R_5 = \text{Ser}$ ; e  $R_6 = \text{Arg}$ .

São particularmente preferidos os péptidos de fórmula geral I (b) com as fórmulas seguintes:

Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

N-metil-L-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

desNH<sub>2</sub>-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>,

desNH<sub>2</sub>-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub> e

N-metil-L-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>.

A presente invenção engloba também os análogos lineares dos péptidos anteriormente referidos com a condição de B na posição 21 não representar Lys nem de A na posição 25 repre-

4.

sentar Asp, e os sais farmacêuticamente aceitáveis destes péptidos cíclicos e lineares.

Os péptidos podem ser sintetizados utilizando processos adequados bem conhecidos na especialidade, tais como a síntese de fase sólida exclusiva, processos em fase sólida parcial, síntese por condensação de fragmentos ou em solução clássica. Também é possível utilizar as técnicas recombinantes de ADN para os compostos lineares que contenham apenas resíduos de aminoácidos naturais. De preferência, os péptidos da presente invenção são preparados por síntese peptídica em fase sólida conforme descrito por Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 1963, p. 2149. Efectua-se a síntese com os aminoácidos que estão protegidos no terminal alfa-amino. Os aminoácidos trifuncionais com cadeias laterais estáveis são também protegidos com grupos adequados os quais evitarão que ocorra uma reacção química no local durante a construção do péptido. O grupo protector do grupo alfa-amino é removido selectivamente para permitir que ocorram as subseqüentes reacções de acoplamento no terminal amino. As condições para a remoção do grupo protector do grupo alfa-amino não originam a desprotecção dos grupos protectores da cadeia lateral.

Os grupos protectores do grupo alfa-amino são os conhecidos na especialidade da síntese sequencial de péptidos, incluindo os grupos protectores do tipo acilo (por exemplo formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos protectores do tipo uretana aromáticas (por exemplo benziloxi-carbonilo (Cbz) e benziloxi-carbonilo substituído), grupos protectores do tipo

uretana alifática (por exemplo t-butiloxi-carbonilo (Boc), isopropiloxi-carbonilo, ciclo-hexiloxi-carbonilo) e grupos protectores do tipo alquilo (por exemplo benzilo, trifenil-metilo). O grupo protector preferido é o Boc. Os grupos protectores da cadeia lateral para Tyr englobam o tetra-hidropiraniolo, terc-butilo, tritilo, benzilo, Cbz, Br-Cbz, e 2,6-dicloro-benzilo. O grupo protector da cadeia lateral preferido para Tyr é o 2,6-dicloro-benzilo. Os grupos protectores da cadeia lateral para Asp englobam o benzilo, 2,6-dicloro-benzilo, metilo, etilo e ciclo-hexilo. O grupo protector da cadeia lateral preferido para Asp é o ciclo-hexilo. Os grupos protectores da cadeia lateral para Thr e Ser englobam o acetilo, benzoílo, tritilo, tetra-hidropiraniolo, benzilo, 2,6-dicloro-benzilo e Cbz. O grupo protector preferido para Thr e Ser é o benzilo. Os grupos protectores da cadeia lateral para Arg englobam o grupo nitro, tosilo (Tos), Cbz, adamatiloxi-carbonilo, mesitoil-sulfonilo (Mts) ou Boc. O grupo protector preferido para Arg é o Tos. O grupo amino de cadeia lateral de Lys pode ser protegido com Cbz, 2-cloro-benziloxi-carbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromo-benziloxi-carbonilo (2-BrCbz), Tos ou Boc. O 2-Cl-Cbz é o grupo protector preferido para Lys. A selecção dos grupos protectores da cadeia lateral baseia-se no seguinte: o grupo protector da cadeia lateral permanece intacto durante o acoplamento e não é cindido durante a desprotecção do grupo protector de amino-terminal ou durante as condições de acoplamento. Todavia, o grupo da cadeia lateral deve ser removível depois de se completar a síntese do péptido, em condições de reacção que não alterem o péptido pretendido.

4.

A síntese em fase sólida é normalmente realizada a partir do terminal carboxilo do péptido que se pretende sintetizar, por acoplamento do aminoácido alfa-amino-prottegido (cadeia lateral protegida) a um suporte sólido adequado. Forma-se uma ligação éster quando se faz a união de uma resina clorometilada ou hidroximetilada e o péptido pretendido resultante possuirá um grupo carboxilo livre no terminal C. Em alternativa, utiliza-se uma resina de benzidrilamina ou de p-metil-benzidrilamina, formando-se nesse caso uma ligação amida e o péptido pretendido resultante possuirá um grupo carboxamida no terminal C. Estas resinas encontram-se comercialmente disponíveis e a sua preparação foi descrita por Stewart e outros, Solid Phase Peptide Synthesis, Rockford, IL., Pierce Chemical Co., 29 Ed., 1984.

No caso do Arg protegido na cadeia lateral com (Tos) e na função alfa-amino com Boc, por exemplo como no aminoácido C-terminal, o referido aminoácido é acoplado à resina de benzidrilamina utilizando diversos agentes activadores incluindo diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida carbonil-diimidazol ou hexafluoro-fosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfónio (BOP). Após a união ao suporte de resina o grupo protector de alfa-amino é removido utilizando o ácido trifluoroacético (TFA) ou HCl em dioxano, a uma temperatura compreendida entre 0°C e 25°C. Adiciona-se sulfureto de dimetilo ao TFA após a introdução de metionia (Met) para suprimir uma possível S-alquilação. Após a remoção do grupo protector de alfa-amino, os aminoácidos protegidos remanescentes são acoplados sequencialmente pela ordem pretendida para se

obter a sequência péptida desejada. É possível utilizar diversos agentes activadores para as reacções de acoplamento incluindo DCC, N,N'-diisopropil-carbodiimida, hexafluoro-fosfato de (benzotriazol-1-il-oxi)-~~tr~~is(dimetilamino) *J*-fosfónio (BOP) e DCC-hidroxi-benzotriazol (HOBT). Cada aminoácido protegido é utilizado em excesso (> 2,5 equivalentes) e os acoplamentos são efectuados normalmente no seio de dimetilformamida (DMF), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ou suas misturas.

O grau de completamento da reacção é seguida em cada passo pela reacção da ninidrina conforme descrito por Kaiser e outros, Anal. Biochem., 34, 1970, p. 595. Nos casos de acoplamento incompleto repete-se a referida reacção de acoplamento. As reacções de acoplamento podem ser efectuadas automaticamente num sintetizador Vega 250, Applied Biosystems ou noutros instrumentos comercialmente disponíveis. Após a construção completa do péptido que se pretende sintetizar, faz-se reagir o péptido-resina sintetizado primeiro com TFA/ditio-etano e depois com um reagente tal como o ácido fluorídrico líquido durante 1 a 2 horas à temperatura de 0°C, para se separar o péptido da resina e para se remover todos os grupos protectores da cadeia lateral.

A ciclização do tipo cadeia lateral com cadeia lateral sobre o suporte sólido exige a utilização de um esquema de protecção ortogonal que permita a clivagem selectiva das funções da cadeia lateral dos aminoácidos ácidos (por exemplo Asp) e dos aminoácidos básicos (por exemplo Lys). O grupo protector 9-fluorenil-metilo (Ofm) para a cadeia lateral do Asp e o

grupo protector 9-fluorenil-metoxi-carbonilo (Fmoc) para a cadeia lateral do Lys podem ser utilizados para satisfazer este objectivo. Nestes casos, os grupos protectores da cadeia lateral (OFm e Fmoc) do conjunto péptido/resina protegido por BOC são removidos selectivamente com piperidina no seio de dimetilformamida. Consegue-se fazer a ciclização sobre o suporte sólido utilizando diversos agentes activadores incluindo DCC, DCC/HOBt ou BOP. A reacção com ácido fluorídrico efectua-se sobre o conjunto péptido/resina ciclizado conforme anteriormente descrito.

No Quadro 1 apresenta-se um protocolo para um ciclo de síntese típico de uma dessas sínteses em fase sólida.

Quadro 1Protocolo para um ciclo de síntese típico<sup>a</sup>

<u>Passo</u>	<u>Reagente</u>	<u>Tempo</u>
1	1% DMS <sup>d</sup> /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 x 1 min
2	50% TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 1% DMS (v/v)	1 x 1 min
3	1% DMS/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 x 1 min
4	50% TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 1% DMS (v/v)	1 x 20 min
5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 1 min <sup>b</sup>
6	10% DIEA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 x 5 min
7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 1 min
8	repetir os passos 6, 7	
9	MeOH	2 x 1 min
10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 1 min
11a	2,5 eq. Boc-AA-COOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 min <sup>c</sup>
b	2,5 eq. DCC <sup>e</sup> /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60 min
c	1,5% DIEA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15 min
12	repetir os passos 10, 12	
13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 1 min
14	MeOH	1 x 1 min
15	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 x 1 min <sup>b</sup>

a Os dissolventes para todos os passos de lavagem e de acoplamento foram medidos até volumes de 15-20 ml/g de resina.

b Teste de ninidrina de Kaiser

c DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para Boc-Arg(Tos)-OH

d "DMS" significa sulfureto de dimetilo

e "DCC" significa diciclo-hexil-carbodiimida



Pode efectuar-se a purificação dos polipéptidos da presente invenção utilizando procedimentos bem conhecidos na química dos péptidos. Os polipéptidos da presente invenção podem ser purificados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (hplc); todavia, também é possível utilizar outros procedimentos cromatográficos conhecidos tais como a impregnação de gel, permuta iónica e cromatografia de repartição ou distribuição em contracorrente.

A presente invenção refere-se também a um método para estimular a libertação da hormona do crescimento num paciente, por administração a esse paciente de uma quantidade eficaz de compostos da presente invenção.

Os poli-péptidos da presente invenção possuem actividade libertadora da hormona do crescimento. As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção incorporam análogos de 29 a 44 aminoácidos de comprimento, ou um sal não tóxico de qualquer destes aminoácidos, dispersos num veículo líquido ou sólido aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ou aceitável em veterinária. Essas composições farmacêuticas podem ser utilizadas para fins terapêuticos em medicina humana e em veterinária. Por exemplo, são utilizáveis no tratamento de doenças associadas ao crescimento tais como o nanismo hipopituitário e diabetes resultantes de anormalidades na produção da hormona do crescimento, ou para melhorar a cicatrização de ossos, ferimentos ou queimaduras, ou a osteoporose. Além disso, também podem ser usados para estimular o crescimento ou para aumentar a eficiência alimentar dos animais criados para a produ-

ção de carne no sentido de melhorar a qualidade da carne produzida, ou para aumentar a produção de leite e estimular a produção de ovos. Os compostos da presente invenção podem ser utilizados também para fins de diagnóstico em medicina humana e em veterinária.

As dosagens apropriadas dos polipéptidos da presente invenção que se pretende administrar variarão conforme o paciente e mais especificamente com o grau de insuficiência de produção da hormona do crescimento e com as condições do tratamento. Um especialista na matéria será capaz de determinar as dosagens apropriadas baseado nos níveis de circulação conhecidos da hormona do crescimento associados ao crescimento normal e na actividade de libertação dessa hormona do crescimento do polipeptido da presente invenção. Mais especificamente, pode utilizar-se uma dosagem compreendida entre 0,04 ug/kg/dia e cerca de 20,0 ug/kg/dia tomando como base o peso do corpo do paciente, para estimular a libertação da hormona do crescimento. As dosagens utilizadas para estimular a actividade de crescimento na criação de gado serão significativamente superiores (por kg do corpo do animal) às dosagens utilizadas para estabelecer o crescimento normal nos casos de deficiências em hormonas do crescimento, tal como sucede no nanismo pituitário nos seres humanos. Geralmente na criação de gado pode utilizar-se uma dosagem compreendida aproximadamente entre 0,4 ug/kg/dia e 100 ug/kg/dia, administrada subcutaneamente, para estimular a libertação da hormona pituitária do crescimento.

Deste modo, de acordo com a presente invenção proporciona-se um método para o tratamento de doenças associadas ao

crescimento, caracterizadas por produção insuficiente da hormona do crescimento, o qual consiste em administrar a um mamífero uma quantidade dos compostos da presente invenção suficiente para estimular a produção da hormona do crescimento para níveis associados ao crescimento normal.

Os níveis normais de hormona do crescimento variam consideravelmente entre os diversos indivíduos e, para um determinado indivíduo, os níveis de hormona do crescimento em circulação variam consideravelmente ao longo de um dia. Nos seres humanos adultos, os níveis de hormona do crescimento no soro normal variam entre 0-10 nanogramas/ml. Nas crianças os níveis de hormona do crescimento no soro normal variam entre 0-20 nanogramas/ml.

Com o objectivo de tratar eficazmente o nanismo hipopituitário com os análogos descritos, faz-se o tratamento durante o período de crescimento normal. Nas fêmeas este período geralmente não vai além do começo da puberdade. Deste modo o tratamento das fêmeas deverá ser efectuado aproximadamente numa idade compreendida entre os 12 e 16 anos, dependendo do indivíduo. Nos machos a estimulação do crescimento pode ser possível durante um período mais longo que se estende para além da puberdade. Assim, o tratamento eficaz dos machos será possível normalmente até aos 18 ou 19 anos de idade e em alguns casos até aos 25 anos de idade.

Proporciona-se também um método para aumentar a taxa de crescimento de animais administrando-lhes uma quantidade dos compostos da presente invenção suficiente para estimular a produção da hormona do crescimento a um nível superior ao

correspondente ao crescimento normal.

Os polipéptidos da presente invenção podem ser administradas sob a forma de composições farmacêuticas para utilização em seres humanos ou em veterinária, as quais podem ser preparadas por técnicas de formulação farmacêutica convencionais. É possível utilizar composições adequadas para administração por via oral, intravenosa subcutânea, intramuscular, intraperitonal, intranasal, intraocular, bucal ou transdermal. Uma forma de dosagem adequada para utilização farmacêutica incorpora entre cerca de 0,01 e 0,5 mg do composto da presente invenção, o qual pode ser liofilizado para reconstituição com água esterilizada ou com uma solução salina. A composição deverá ser mantida com um pH inferior a 5,0, para se manter a estabilidade do análogo. Também se pode incorporar albumina do soro das espécies que se pretende tratar (por exemplo, albumina de soro de seres humanos, albumina do soro de bovinos, no caso dos bovinos, e assim por diante), juntamente com outros adjuvantes farmacêuticos.

A presente invenção será descrita por meio dos exemplos seguintes que são apresentados apenas com fins ilustrativos.

Exemplo 1

Síntese do Ciclo<sup>21,25</sup>[Ala<sup>15</sup>]-GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Desprotegeu-se Boc-Arg(Tos)-BHA-resina (9,5 g; 0,348 meq/g; 3,31 meq) e neutralizou-se de acordo com o protocolo descrito no Quadro 1. Removeu-se uma porção de intermédio Boc-GRF(26-29)-BHA-resina (3,36 g; 0,975 mmole) e manteve-se a síntese sequencial em fase sólida conforme anteriormente descrito para

4.

5 ciclos de síntese em fase sólida incluindo a utilização de Boc-Asp<sup>25</sup> (OFm)-OH e Boc-Lys<sup>21</sup>(Fmoc)-OH para proporcionar Boc-[-Lys<sup>21</sup>(Fmoc), Asp<sup>25</sup>-(OFm)]-GRF(21-29)-BHA-resina.

Desprotegeu-se este intermédio com 20% de piperidina/DMF durante 20 minutos para proporcionar - Boc-[-Lys<sup>21</sup>, Asp<sup>25</sup>]-GRF(21-29)-BHA-resina - e ciclizou-se por reacção com o reagente BOP (1,37 g; 2,93 mmoles, 3 eq) em DMF (50 ml) contendo diisopropiletilamina (DIEA) (1,02 ml; 5,86 mmoles); 6 eq durante 2 horas. Após a lavagem repetiu-se a ciclização mais duas vezes durante 12 horas e 3 horas, respectivamente, (teste da ninidrina de Kaiser negativo). Manteve-se a síntese de fase sólida durante mais 8 ciclos para proporcionar 4,60 g (0,975 mmole) de - Boc-[-Ala<sup>15</sup>]-Ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(13-29)-BHA-resina -. Submeteu-se uma porção (1,0 g; 0,212 mmole) a 10 ciclos adicionais de síntese de fase sólida para proporcionar 1,15 g de - Boc-[-Ala<sup>15</sup>]-Ciclo<sup>21,25</sup> GRF(13-29)-BHA-resina.

Após a construção de - Boc-[-Ala<sup>15</sup>]-Ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(13-29)-BHA-resina, submeteu-se uma porção (0,57 g; 0,106 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida com - Boc-Ala-OH e Boc-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro 1. Crivou-se o péptido/resina com ácido fluorídrico (HF) (aproximadamente 10 ml) contendo 1-propano-tiol (1,62 ml) à temperatura de 0°C durante 2 horas. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com acetato de etilo (EtOAc), a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 187,4 mg de produto bruto.

Dissolveu-se o produto bruto (187,4 mg) em 10 ml de TFA a 0,025%/H<sub>2</sub>O, agitou-se, filtrou-se e aplicou-se sobre 2



colunas Synchronapak RP-P de 1,0 cm x 25 cm cada uma. Eluentes: (A) H<sub>2</sub>O (TFA a 0,025%), (B) acetonitrilo [ACN] (TFA a 0,025%); gradiente linear, 20-45% (B) em 120 minutos; caudal 2 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto. As fracções 47-49 foram reunidas e liofilizadas para proporcionar 3,0 mg de produto semi-puro.

Purificou-se novamente o produto semi-puro (3,0 mg) numa coluna Nucleosil C-18 (1,0 cm x 50 cm; 5 u). Eluente: (A) H<sub>2</sub>O/(TFA a 0,1%), (B) ACN/(TFA a 0,1%); gradiente linear, 20-40% (B) em 120 minutos; caudal 3 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto. As fracções 113-114 foram reunidas e liofilizadas para proporcionar 0,8 mg de produto, tendo-se verificado a homogeneidade por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por bombardeamento com átomos rápidos (BAR) (peso molecular calculado [PM]: 3354,9; PM encontrado: 3354,2). A confirmação da sequência foi feita por análise de sequência, a qual confirmou também a existência da lactama nas posições 21-25.

Exemplo 2

Síntese de Ciclo<sup>21,25</sup> [N-metil-L-Tyr<sup>1</sup>,

D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>] -GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Ala<sup>15</sup>] -Ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(3-29)-BHA-resina - (0,70 g; 0,166 mole) (ver Exemplo 1) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-D-Ala-OH e Boc-N-metil-L-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH - conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com ácido fluorídrico (aproximada-

- 22 -  
4.

mente 10 ml) contendo 1-propano-tiol (2,1 ml) à temperatura de 0°C durante 2 horas. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 180 mg de produto bruto.

Dissolveu-se o produto bruto (180 mg) em 5 ml de H<sub>2</sub>O/ (TFA a 0,025%), agitou-se, centrifugou-se, e aplicou-se em duas colunas Synchropak RP-P (1 x 25 cm cada coluna). Eluente: (A) H<sub>2</sub>O/(TFA a 0,025%), (B) ACN/(TFA a 0,025%); gradiente linear 20-45% de (B) em 120 minutos; caudal, 2 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto (2 ml por tubo). As fracções 49-51 foram reunidas e liofilizadas para proporcionar 5,6 mg de produto semi-puro.

Purificou-se novamente o produto semi-puro (5,6 mg) numa coluna Nucleosil C-18 conforme descrito no Exemplo 1. As fracções 109-110 foram reunidas e liofilizadas para proporcionar 1,11 mg de produto tendo-se verificado que era homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado 3368,9; PM encontrado 3367,9).

### Exemplo 3

Síntese de Ciclo<sup>21,25</sup> [ D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup> ]-GRF(1-29)NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Ala<sup>15</sup>]-ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(3-29)-BHA-resina - 1,0 g; 0,136 mmole) (ver Exemplo 1) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-D-Ala-OH e Boc-Tyr (2,6-Cl<sub>2</sub> Bzl)-OH - conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com ácido fluorídrico (aproximadamente 10 ml)



contendo propano-tiol (3 ml) durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA( 4 x 10 ml), a evaporação e trituração com éter para proporcionar 403 mg de produto bruto. Efectuou-se a purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento geral descrito no Exemplo 1. Verificou-se que o produto era homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3354,9; PM encontrado 3354,9). Análise de aminoácidos (HCl 6H, 110°C, 24 H): Asp, 2,67; Thr, 0,90; Ser, 2,72; Glu, 2,02; Ala, 4,00; Val, 0,90; Met, 0,90; Ile, 1,78; Leu, 3,82; Tyr, 1,77; Phe, 0,83; Lys, 1,76; Arg, 2,77.

Exemplo 4

Síntese de Ciclo<sup>21,25</sup> [ N-metil-L-Tyr<sup>1</sup>, Ala<sup>15</sup> ] -  
-GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Ala<sup>15</sup>] -ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(3-29)-BHA-resina - (ver Exemplo 1) (1,0 g; 0,0136 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-Ala-OH e Boc-N-metil-L-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com ácido fluorídrico (aproximadamente 10 ml) contendo propano-tiol (3 ml) durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 222 mg de produto bruto. Efectuou-se a purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento geral descrito no

Exemplo 1. Verificou-se que o produto era homogêneo por HPLC analítica. A confirmação de estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado 3368,9; PM encontrado: 3368,8). Análise de aminoácidos (HCl 6M, 110°C, 72 h): Asp, 3,08; Thr, 1,05; Ser, 3,25; Glu, 2,32; Ala, 4,45; Val, 0,63; Met, 1,00; Ile, 1,59; Leu, 4,04; Tyr, 1,11; Phe, 0,61; Lys, 1,60; Arg, 3,10.

Exemplo 5

Síntese de Ciclo<sup>21,25</sup> [desNH<sub>2</sub>-Tyr<sup>1</sup>, Ala<sup>15</sup>] -GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Ala<sup>15</sup>] -ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(3-29)-BHA-resina - (ver Exemplo 1) (1,0 g; 0,136 mmole) a dois ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-Ala-OH e desNH<sub>2</sub>-Tyr-OH - , conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com ácido fluorídrico (aproximadamente 10 ml) contendo propano-tiol (3 ml), durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extração com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração para proporcionar 208 mg de produto bruto. A purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento descrito no Exemplo 1 proporcionou um produto que se verificou ser homogêneo de acordo com a HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3339,9; PM encontrado: 3340,3).

Exemplo 6

Síntese de Ciclo<sup>21,25</sup> [desNH<sub>2</sub>-Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>] -GRF (1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Ala<sup>15</sup>] -ciclo<sup>8,12</sup>-GRF(3-29)-BHA-

- 2 -

-resina (ver Exemplo 1) (1,0 g; 0,136 mmole) a dois ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-D-Ala-OH e desNH<sub>2</sub>-Tyr-OH, conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com ácido fluorídrico (aproximadamente 10 ml) contendo propano-tiol (3 ml), durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação, seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração para proporcionar 432 mg de produto bruto. A purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento descrito no Exemplo 1 proporcionou um produto que se verificou ser homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3339,9; PM encontrado: 3339,0).

#### Exemplo 7

#### Síntese de Diciclo<sup>8,12;21,25</sup> [ Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup> ] GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc [ Ala<sup>15</sup> ] -ciclo<sup>21,25</sup>-GRF (13,29)-BHA-resina (ver Exemplo 1) (2,50 g; 0,53 mmole) a 5 ciclos de síntese de fase sólida incluído a utilização de Boc-Lys<sup>12</sup>-(Fmoc)-OH e Boc-Asp<sup>8</sup>(OFm)-OH, para proporcionar 2,92 g de - Boc- [ Asp<sup>8</sup>(OFm), Lys<sup>12</sup>(Fmoc), Ala<sup>15</sup> ] -ciclo<sup>21,25</sup>-GRF(8-29)-BHA-resina. Desprotegeu-se uma porção (1,95 g; 0,053 mmole) com 20% de piperidina/DMF durante 20 minutos para proporcionar - Boc- [ Asp<sup>8</sup>, Lys<sup>12</sup>, Ala<sup>15</sup> ] -ciclo<sup>21,25</sup>-GRF (8-29)-BHA-resina, e depois ciclizou-se por reacção com o reagente BOP (469 mg; 1,06 mmole; 3 eq) em DMF (40 ml) contendo diisopropiletilamina (0,37 ml; 2,12 mmole; 6 eq) durante 4 horas. Após a lavagem, repetiu-se a ciclização mais 2 vezes, durante 17 horas e durante



6 horas, respectivamente (teste da ninidrina de Kaiser negativo). Manteve-se a síntese de fase sólida durante mais 5 ciclos para proporcionar aproximadamente 2 g de - Boc- $\Gamma$  Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>  $\mathcal{J}$ -diciclo<sup>8,12;21,25</sup>-GRF(3-29)-benzidril-amina-resina.

Após a construção de - Boc- $\Gamma$  Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>  $\mathcal{J}$ -diciclo<sup>8,12;21,25</sup>-GRF(3-29)-BHA-resina, submeteu-se uma porção (1,0 g; 0,177 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida com -Boc-Ala-OH e Boc-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se uma porção (0,52; 0,088 mmole) com ácido fluorídrico (aproximadamente 10 ml) contendo 1-propano-tiol (1,56 ml) à temperatura de 0°C durante 2 horas. Após a evaporação do ácido fluorídrico seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 99,8 mg de produto bruto.

Dissolveu-se o produto bruto (99,8 mg) de TFA a 0,025%/H<sub>2</sub>O e purificou-se tal como no Exemplo 1. Reuniu-se as fracções 80-82 e evaporou-se e depois purificou-se numa coluna Nucleosil C-18 conforme descrito no Exemplo 1. Reuniu-se as fracções 145-146 e liofilizou-se para proporcionar 0,65 mg de produto tendo-se determinado que era homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3337,9; PM encontrado: 3337,9). A confirmação adicional da sequência foi feita por análise de sequência a qual confirmou as lactamas nas posições 21,25 e 8,12.

Exemplo 8

Síntese de diciclo<sup>8,12;21,25</sup>  $\Gamma$  N-metil-L-Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>, Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>  $\mathcal{J}$ -GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc- $\Gamma$  Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>  $\mathcal{J}$ -diciclo<sup>8,12;21,25</sup>-GRF-

4.

(3-29)-BHA-resina (ver Exemplo 7) (1,0 g; 0,177 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida com - Boc-D-Ala-OH e Boc-N-metil-L-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se uma porção (0,53 g; 0,088 mmole) com HF (aproximadamente 10 ml) contendo 1-propano-tiol (1,59 ml) à temperatura de 0°C durante 2 horas. Após a evaporação do HF, seguiu-se a lavagem com EtOAc, e extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 101,8 mg de produto bruto.

Dissolveu-se o total de 200,7 mg de produto bruto em 10 ml de H<sub>2</sub>O/(TFA a 0,0025%), agitou-se, centrifugou-se, filtrou-se e aplicou-se a 2 colunas Synchropak RP-P (1 x 25 cm cada coluna). Eluente: (A) H<sub>2</sub>O/(TFA a 0,0025%), (B) ACN/(TFA a 0,0025%; gradiente linear 20-45% de (B) em 120 minutos; débito de 2 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto (2 ml/tubo). Reuniu-se as fracções 75-76 e liofilizou-se para proporcionar 3,4 mg de produto semi-puro.

Purificou-se o produto semi-puro (3,4 mg) numa coluna Nucleosil C-18 conforme descrito no Exemplo 1. Reuniu-se as fracções 122-123 e liofilizou-se para proporcionar 0,58 mg de produto tendo-se determinado que era homogéneo por HPLC. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3352,9; PM encontrado: 3352,2). Análise de aminoácidos (HCl 6M, 110°C, 24h): Asp, 2,8; Thr, 0,9; Ser, 2,9; Glu, 2,5; Ala, 3,4; Val, 1,1; Met, 1,2; Ile, 2,1; Leu, 4,9; Phe, 1,0; Lys, 1,7; Arg, 3,6.

Exemplo 9

Síntese de diciclo<sup>8,12;21,25</sup> [D-Ala<sup>2</sup>, Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>] -  
-GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>] -diciclo<sup>8,12;21,25</sup> -  
-GRF-(3-29)-BHA-resina (ver Exemplo 7) (1 g; 0,14 mmole) a  
2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-D-  
-Ala-OH e Boc-Tyr(2,6 Cl<sub>2</sub> Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro  
1. Clivou-se o péptido-resina com HF (aproximadamente 10 ml)  
contendo propano-tiol (3 ml) durante 2 horas à temperatura  
de 0°C. Após a evaporação do HF seguiu-se a lavagem com EtOAc,  
a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração  
com éter para proporcionar 431 mg de produto bruto. A purifi-  
cação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento  
do Exemplo 7 proporcionou um produto que se verificou ser homo-  
géneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita  
por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3337,9;  
PM encontrado: 3337,2).

Exemplo 10

Síntese de diciclo<sup>8,12;21,25</sup> [N-metil-L-Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>8</sup>,  
Ala<sup>15</sup>] -GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

Submeteu-se - Boc-[Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>] -diciclo<sup>8,12;21,25</sup> -  
-GRF(3-29)-resina (ver Exemplo 7) (1 g; 0,14 mmole) a 2 ciclos  
finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-Ala-OH e  
Boc-N-metil-L-Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH, conforme resumido no Quadro  
1. Clivou-se o péptido-resina com HF (aproximadamente 10 ml)  
contendo propano-tiol (3 ml) durante 2 horas à temperatura de



0°C. Após a evaporação do HF seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 386 mg de produto bruto. A purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento do Exemplo 7 proporcionou um produto que se verificou ser homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3352,0; PM encontrado: 3351,5).

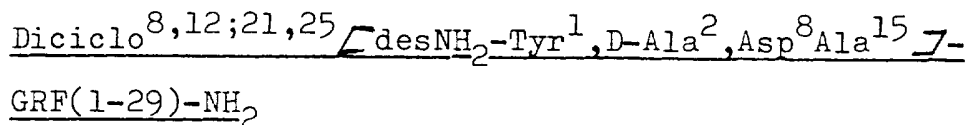
Exemplo 11

Síntese de diciclo<sup>8,12;21,25</sup> [desNH<sub>2</sub>-Tyr<sup>1</sup>,

Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>]-GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

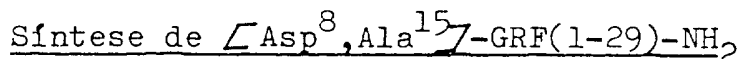
Submeteu-se - Boc-[Asp<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>]-diciclo<sup>8,12;21,25</sup>-GRF (3-29)-BHA-resina (ver Exemplo 7) (1 g; 0,14 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-Ala-OH e desNH<sub>2</sub>-Tyr-OH, conforme descrito no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com HF (aproximadamente 10 ml) contendo propano-tiol (3 ml) durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação do HF seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extracção com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 403 mg de produto bruto. A purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento do Exemplo 7 proporcionou um produto que se verificou ser homogéneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3322,9; PM encontrado: 3322,2).

Exemplo 12



Submeteu-se - Boc-[Asp<sup>8</sup>,Ala<sup>15</sup>] -diciclo<sup>8,12;21,25</sup> -GRF(3-29)-BHA-resina (ver Exemplo 7) (1 g; 0,14 mmole) a 2 ciclos finais de síntese de fase sólida utilizando - Boc-D-Ala-OH e desNH<sub>2</sub>-Tyr-OH, conforme resumido no Quadro 1. Clivou-se o péptido-resina com HF (aproximadamente 10 ml) contendo propano-tiol (2,1 ml) durante 2 horas à temperatura de 0°C. Após a evaporação do HF seguiu-se a lavagem com EtOAc, a extração com TFA (4 x 10 ml), a evaporação e a trituração com éter para proporcionar 430 mg de produto bruto. A purificação por HPLC de fase inversa utilizando o mesmo procedimento do Exemplo 7 proporcionou um produto que se verificou ser homogêneo por HPLC analítica. A confirmação da estrutura foi feita por espectroscopia de massa por BAR (PM calculado: 3322,9; PM encontrado: 3323,0).

Exemplo 13



Partindo de - Boc-Arg(Tos)-BHA-resina (ver Exemplo 1) fez-se a construção pelo processo de síntese de fase sólida conforme anteriormente descrito (ver também o Quadro 1) para proporcionar Boc-[Asp<sup>8</sup> (OFm) Lys<sup>21</sup>(Fmoc)-Ala<sup>15</sup>] -GRF(1-29)-BHA-resina. Desprotegeu-se uma porção de 1 g de resina (0,26 mmole) com 20% de piperidina/DMF durante 20 minutos para proporcionar - Boc-[Asp<sup>8</sup>,Ala<sup>15</sup>] -GRF(1-29)-BHA-resina. A resina

peptídica parcialmente protegida foi clivada com HF tal como no Exemplo 2 para proporcionar 117 mg de produto bruto.

Dissolveu-se o produto bruto (117 mg) em 8 ml de H<sub>2</sub>O (contendo 0,0025% de TFA), filtrou-se e aplicou-se sobre duas colunas Synchropak RP-P (1 x 25 cm cada). Eluente: (A) H<sub>2</sub>O/ (0,0025% de TFA), (B) ACN/(0,0025% de TFA); gradiente linear 20-45% de (B) em 120 minutos; caudal 2 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto. Reuniu-se as fracções 74-80 e liofilizou-se para proporcionar 16 mg de produto semi-puro.

Dissolveu-se o produto semi-puro (16 mg) em água (aproximadamente 3 ml) e purificou-se novamente numa coluna Nucleosil C-18 (1 x 50 cm). Eluente: (A) H<sub>2</sub>O/(0,25% de TFA), (B) ACN/ (0,025% de TFA); gradiente linear 20-45% de (B) em 120 minutos; caudal de 2,5 ml/minuto. As fracções foram recolhidas a intervalos de 1 minuto e na quantidade de 25 ml/fracção. Reuniu-se as fracções 92, 94-97 e liofilizou-se para proporcionar 6,6 mg de produto. Análise de aminoácidos (HCl 6M, 110°C 24 h): Asp, 3,04; Thr, 0,95; Ser, 2,81; Glu, 2,11; Ala, 4,16; Val, 0,98; Met, 0,96; Ile, 1,9; Leu, 4,13; Tyr, 2,03; Phe, 0,92; Lys, 1,95; Arg, 3,09.

#### Exemplo 14

#### Ensaio do GRF in vitro (dispersão celular)

Após a decapitação procedeu-se assepticamente à remoção das pituitárias de 30-40 ratas macho Sprague-Dawley (175 g). Fez-se a recolha dos lóbulos anteriores, lavou-se 3 vezes com tampão Hepes esterilizado (0,025M) (pH 7,35) e fez-se a disper-



são a 37°C em 20-30 ml de tampão Hepes (pH 7,35) contendo colagenase (4 mg por ml) e Dispase (Protease de grau II, 2 mg por ml). Após agitação suave durante 100-110 minutos e após trituração com uma pipeta de Pasteur, separou-se por centrifugação (150 x g; 4 minutos) as células dispersas e fez-se nova suspensão em tampão Hepes contendo neuraminidase (8 g/ml) e adicionou-se 200 g/ml de sal di-sódico de ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA), pH 7,35, durante 10 minutos.

Procedeu-se à lavagem das células duas vezes com o meio de espalhamento do inóculo e fez-se a preparação das culturas em placas de múltiplas cavidades (1,5 x 10<sup>5</sup> células por ml) utilizando o meio a seguir definido: F-12/DMEM/BGJ (6:3:1) (Gibco: 430-1700/430-1600/320-2591) com 2 g de albumina de soro de bovino (BSA)/l., 2,38 g de Hepes/1,50 mg de mistura antibiótica PSN (Gibco Laboratories), 10 mg de transferrina/l (Sigma T2252) com 1,83 g de NaHCO<sub>3</sub>/l (Baker 3506). O meio de cada tubo foi enriquecido quer com uma amostra do novo péptido GRF quer com GRF(1-44)-NH<sub>2</sub> natural, em concentrações compreendidas entre 0,8 e 200 fmoles por ml de meio ("tratamento individual"). As cavidades de controlo não continham qualquer suplemento ("tratamento individual"). A preparação das culturas foi feito com este meio ao qual se adicionou 2% de soro de vitela fetal para garantir a rápida fixação das células.

Ao quarto dia as células foram lavadas duas vezes com o meio definido sem soro de vitela fetal. Finalmente adicionou-se 900 µl de meio definido a cada cavidade mais 100 µl do mesmo meio contendo cada um dos tratamentos individuais (ante-

riormente definidos), em triplicado. Decorridas 4 horas de incubação recolheu-se o meio e diluiu-se conforme necessário para se realizar um ensaio imunológico de marcação radioactiva (RIAs) para a hormona de crescimento das ratazanas.

O RIAs para a hormona do crescimento das ratazanas foi efectuado utilizando o soro imunológico anti-GH de murganho de Sinha e os procedimentos de acordo com a National Pituitary Agency (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA 90509, EUA, utilizando a proteína A para precipitar o complexo anticorpo/antigénio. Os resultados encontram-se resumidos no Quadro 2.

4.

QUADRO 2

Potências relativas de análogos cíclicos<sup>21,25</sup>  
e bicíclicos<sup>8,12;21,25</sup> do GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>

<u>ANÁLOGO DO GRF</u>	<u>POTENCIA RELATIVA</u>
GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	0,8
GRF(1-44)-NH <sub>2</sub>	1,0
ciclo <sup>21,25</sup> -[Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	1,27
ciclo <sup>21,25</sup> -[D-Ala <sup>2</sup> ,Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	1,99
ciclo <sup>21,25</sup> -[N-metil-L-Tyr <sup>1</sup> , D-Ala <sup>2</sup> ,Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	1,92
ciclo <sup>21,25</sup> -[desNH <sub>2</sub> -Tyr <sup>1</sup> ,Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	1,47
diciclo <sup>8,12;21,25</sup> [Asp <sup>8</sup> ,Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	2,24
diciclo <sup>8,12;21,25</sup> [N-metil-L-Tyr <sup>1</sup> ,D-Ala <sup>2</sup> ,Asp <sup>8</sup> , Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	0,61
[Asp <sup>8</sup> ,Ala <sup>15</sup> ]GRF(1-29)-NH <sub>2</sub>	0,79

Embora a presente invenção tenha sido descrita tomando em consideração a versão preferida, não se pretende limitar o âmbito da presente invenção à forma particular descrita mas, pelo contrário, pretende-se englobar todas as alternativas, modificações e equivalentes que possam ser abrangidos no espírito e no âmbito da presente invenção, conforme definido nas reivindicações anexas.



-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu e seus fragmentos em que o fragmento é reduzido numericamente entre 1 a 15 aminoácidos a partir da extremidade carboxilo;

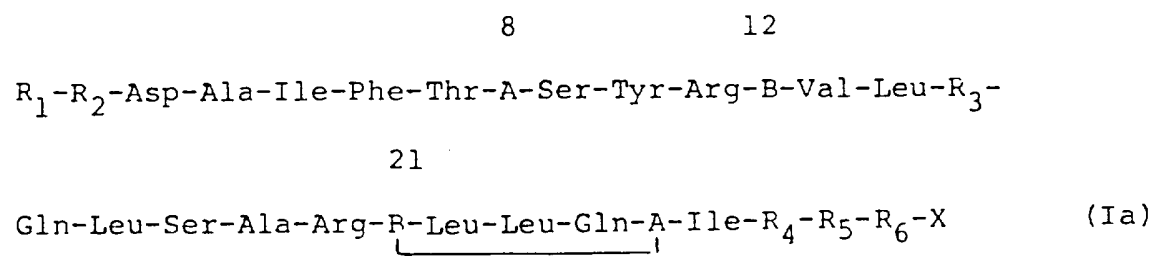
X representa um grupo OH, NH<sub>2</sub>, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub> em que R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou um grupo alquilo inferior;

A representa Asp, Asn, Glu, Gln, ácido α-aminoadípico, ácido α-aminopimélico;

B representa Lys, Orn, ácido diaminopropiônico, ácido diaminobutírico;

e um seu análogo linear com a condição de ou B na posição 21 não representar Lys ou A na posição 25 não representar Asp, e dos seus sais aceitáveis em farmácia, caracterizado pelo facto de se desproteger e/ou cindir um polipeptido protegido e/ou ligado a uma resina da sequência de aminoácidos correspondente a partir da resina com um reagente de cisão adequado e, eventualmente, de se converter em um seu sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se ciclizar nas posições 21, 25 o péptido que se pretende sintetizar e por este possuir a fórmula geral:



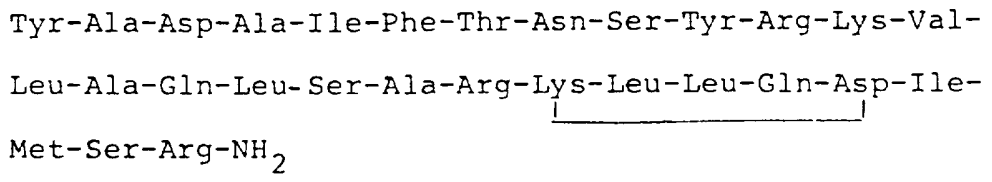
3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de A na posição 8 representar Asn e B na posição 12 representar Lys.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de R<sub>1</sub> representar Tyr, desNH<sub>2</sub>-Tyr, ou N-metil-L-Tyr; R<sub>2</sub> representar Ala, D-Ala; R<sub>3</sub> representar Ala; e X representar NH<sub>2</sub>.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de R<sub>4</sub> representar Met; R<sub>5</sub> representar Ser; e R<sub>6</sub> representar Arg.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de B na posição 21 representar Lys e A na posição 25 representar Asp.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de R<sub>1</sub> representar Tyr e R<sub>2</sub> representar Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:



8.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado

pelo facto de  $R_1$  representar N-metil-L-Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:

N-metil-L-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-  
Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-  
Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

9.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:

Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-  
Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar desNH<sub>2</sub>-Tyr e  $R_2$  representar Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:

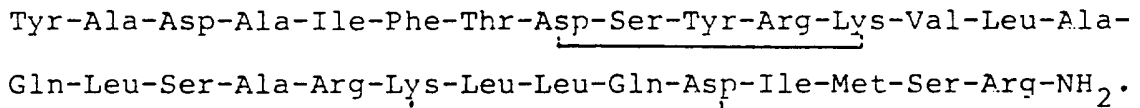
desNH<sub>2</sub>-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-  
Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-  
Arg-NH<sub>2</sub>.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar desNH<sub>2</sub>-Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:

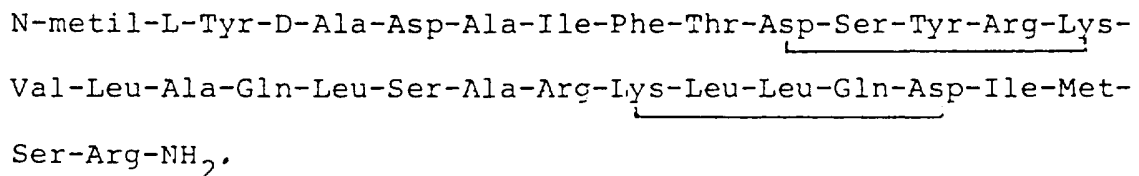
desNH<sub>2</sub>-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-  
Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-  
Ser-Arg-NH<sub>2</sub>.



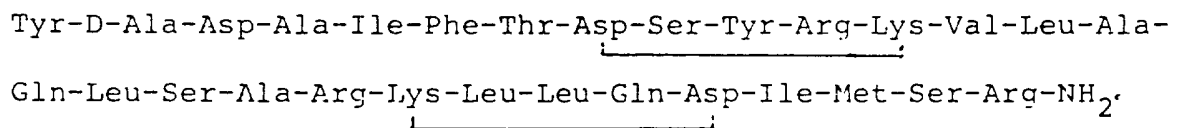
referido péptido possuir a fórmula geral



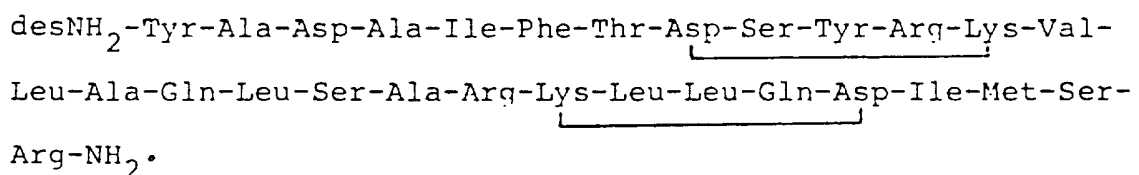
17.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar N-metil-L-Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:



18.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral



19.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar desNH<sub>2</sub>-Tyr e  $R_2$  representar Ala e por o referido péptido possuir a fórmula geral:



20.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de  $R_1$  representar desNH<sub>2</sub>-Tyr e  $R_2$  representar D-Ala e



$R_6$  representa uma sequência de aminoácidos seleccionada entre o grupo constituído por Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu e seus fragmentos em que o fragmento é reduzido numericamente entre 1 a 15 aminoácidos a partir da extremidade carboxilo;

X representa um grupo OH,  $NH_2$ ,  $NR_7R_8$  em que  $R_7$  e  $R_8$  representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo inferior;

A representa Asp, Asn, Glu, Gln, ácido  $\delta$ -aminoadípico, ácido  $\alpha$ -aminopimélico;

B representa Lys, Orn, ácido diaminopropiônico, ácido diaminobutírico;

com a condição de ou B na posição 21 não representar Lys ou A na posição 25 não representar Asp;

e dos seus sais aceitáveis em farmácia, caracterizado pelo facto de se desproteger e/ou cindir um polipeptido protegido e/ou ligado a uma resina de sequência de aminoácidos correspondentes a partir da resina com um reagente de cisão adequado e, eventualmente, de se converter em um sal aceitável em farmácia.

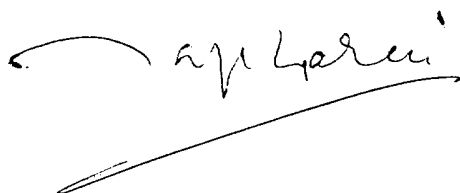
23.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo facto de se misturar um composto preparado por um processo de acordo com uma qualquer das reivindicações de 1 a 22 e, eventualmente, uma ou mais substâncias terapêuticamente activas, com um veículo terapêuticamente inerte e

43

de se converter a mistura em uma forma para administração galé-  
nica,

Lisboa, 05 de Setembro de 1989

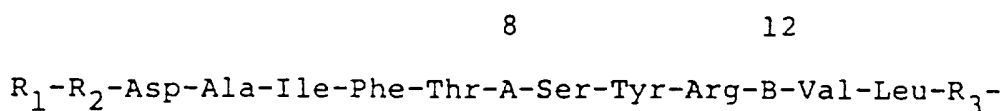
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GRF CÍCLICOS"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de um péptido de fórmula geral

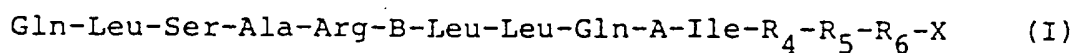


8

12

21

25



com ciclizações nas posições 21, 25 ou 8,12 e 21, 25 e dos seus sais aceitáveis em farmácia, que consiste em desproteger e/ou ciclar a resina com um reagente de cisão adequado, um polipeptido, ligado a uma resina e/ou protegido, de sequência de aminoácidos correspondente, e, eventualmente, em converter num seu sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Lisboa, 05 de Setembro de 1989

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

