MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93.773

NOME: CIBA-GEIGY AG., suiça, industrial, com sede em Klybeckstrasse 141, 4002, Basel, Suiça

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS"

INVENTORES: PETER SIEBER e BERNHARD RINIKER

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
17 de Abril de 1989 sob o No.1429/89-6, na Suiça

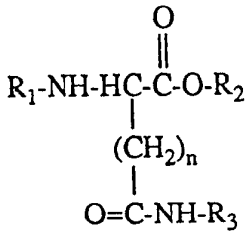
CIBA-GEIGY AG

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AMINOACIDOS PROTEGIDOS"

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de compostos de fórmula (I):



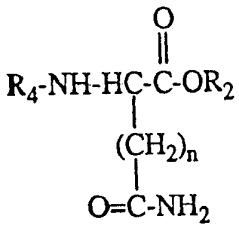
(I)

em que n representa 1 ou 2; R_1 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino; R_2 representa hidrogénio ou um grupo protector do carboxi; R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo; e dos derivados ácidos reactivos destes compostos de fórmula (I) em que R_2 representa hidrogénio.

Estes compostos podem ser usados como materiais de partida para a preparação de peptídeos. São mais adequados para

esta efeito do que os compostos análogos de fórmula (I) em que R_3 representa hidrogénio ou um dos grupos protectores de carbamoílo até aqui usados.

O referido processo de preparação consiste, por exemplo, em se fazer reagir um composto de fórmula (II):



(II)

em que R_4 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino que é estável nas condições da reacção; e n e R_2 têm os significados atrás indicados, com um composto de fórmula (III):

$$R_3\text{-}OH \qquad \text{(III)}$$

em que R_3 tem os significados atrás indicados, e por os grupos protectores que não fazem parte do produto final de fórmula (I) desejado serem eliminados do produto resultante.

O presente invento diz respeito a derivados de aminoácidos contendo grupos N-tritil-carbamoílo, a processos para a sua preparação e à sua utilização na síntese de peptídeos.

Os grupos amida dos aminoácidos asparagina e glutamina são frequentemente responsáveis por reacções secundárias indesejadas no decurso da síntese de peptídeos, por exemplo a desidratação que dá origem ao nitrilo, a ciclização intramolecular que dá origem à imida e, no caso do aminoácido glutamina, a formação de pirrolidona. Além disso, observa-se frequentemente no decurso da síntese em fase sólida com glutamina uma aueência de dilatação por parte das resinas-peptídeos que é consequência da formação intermolecular de ligações a átomos de hidrogénio e que dá origem a um reduzido número de acoplamentos.

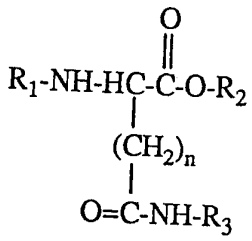
Estas desvantagens podem ser evitadas mediante a protecção dos grupos carbamoílo da asparagina e da glutamina. Os grupos protectores frequentemente utilizados são o 4,4'-dimetoxi--metilo (di-[4-metoxi-fenil]-metilo, 4,4'-dimetoxi-benzidrilo, abreviatura: Mbh) ou o 2,4,6-trimetoxi-benzilo (abreviatura: Tmob).

Contudo, os inventores do presente invento descobriram recentemente serem os próprios grupos carbamoílo conhecidos até à data os responsáveis, em determinados casos, por reacções secundárias indesejadas no decurso da sua eliminação. Este fenómeno tem lugar em consequência de os carbocatiões formados no decurso da eliminação acidolítica reagirem quase imediatamente e de uma forma irreversível com triptofano.

Partindo desta descoberta que, como ponto de partida, já é em certa medida objecto do presente invento, o objectivo dos inventores do presente invento concentrou-se na descoberta de um

grupo carbamoílo que não dê origem às referidas reacções secundárias e na preparação dos correspondentes derivados de aminoácidos protegidos.

O presente invento diz respeito a compostos da fórmula I,



(I)

em que n representa 1 ou 2, R_1 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino, R_2 representa hidrogénio ou um grupo protector de carboxilo e R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo, a sais dos referidos compostos que contenham um grupo formador de sais e a derivados de ácido carboxílico reactivos daqueles compostos da fórmula I em que R_2 representa hidrogénio. A configuração em torno do átomo HC assimétrico é (D,L), (D) ou, preferencialmente, (L).

Na síntese de peptídeos, os compostos da fórmula I não revelam qualquer acção de alquilação em relação à cadeia lateral indole do triptofano. Além disso, a sua obtenção é mais fácil, são mais solúveis em solventes orgânicos e o seu grupo protector de amido pode ser mais facilmente eliminado com ácido trifluoroacético do que os compostos análogos em que R_3 representa 2,4,6-trimetoxi-benzilo (Tmob) ou di-(4-metoxi-fenil)-metilo (Mbh). Por exemplo, as meias-vidas de Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Tmob)-OH e Fmoc-Gln(Mbh)-OH no decurso da clivagem em (ácido

trifluoroacético)/1,2-dicloroetano (1:1) a 22ºC são de 2,9 e 27 minutos, respectivamente.

Os derivados de ácido carboxílico reactivos dos compostos da fórmula I são nitidamente mais estáveis sob condições de acoplamento, isto é, na presença de catalisadores de acoplamento tais como 1-hidroxi-1H-benzotriazole (HOBt) e na presença de solventes geralmente utilizados em reacções de acoplamento na síntese de peptídeos, por exemplo dimetilacetamida (DMA) e 1,2-dicloro-etano (DIEA), que os compostos análogos em que R_3 representa hidrogénio. Por exemplo, as meias-vidas na decomposição de Fmoc-Asn-O-Tcp e Fmoc-Asn-O-Pfp (Fmoc=9-fluorofenil-metoxi-carbonilo, Pfp=pentafluoro-fenilo, Tcp=2,4,5-tricloro-fenilo) em DMA + 1 equivalente de HOBt + 1,7 equivalentes de DIEA são apenas 2 minutos e mesmo menos de 1 minuto, respectivamente, enquanto que os compostso análogos em que R_3 representa um radical tritilo são completamente estáveis sob as mesmas condições.

Surpreendentemente, os volumosos grupos protectores tritilo não diminuem a velocidade das reacções de acoplamento. Pelo contrário, não têm virtualmente qualquer efeito sobre a velocidade das reacções de acoplamento.

A introdução e eliminação de grupos protectores é descrita, por exemplo em "Protective Groups in Organic Chemistry" (Grupos Protectores em Química Orgânica), Plenum Press, Londres, Nova Iorque, 1973, em "Methodem der organischen Chemie" (Métodos da Química Orgânica), Houben-Weyl, 4ª edição, vol. 15/1, Georg-Thieme Verlag, Estugarda, 1974 e em Theodora W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" (Grupos Protectores em Síntese Orgânica); John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1981. Constitui uma característica dos grupos protectores a sua fácil

eliminação, isto é, sem que tenham lugar reacções secundárias indesejadas, por exemplo mediante solvólise, redução, fotólise ou ainda sob condições fisiológicas.

Um grupo amino protegido R_1-NH pode encontrar-se sob a forma de um dos grupos facilmente cliváveis acilamino, arilmetil-amino, mercaptoamino eterificado, 2-acil-(alq-1-uenilo inferior)--amino ou sililamino.

Acilo representa num correspondente grupo acilamino, por exemplo, o radical acilo de um ácido carboxílico orgânico com, por exemplo, um máximo de 18 átomos de carbono, em particular de um ácido alcanocarboxílico facultativamente substituído, por exemplo, com halogénio ou arilo ou um ácido benzóico facultativamente substituído, por exemplo, com halogénio, alcoxi inferior ou nitro ou um monoéster de ácido carbónico. São exemplos destes grupos acilo: alcanoílo inferior tal como formilo, acetilo ou própionilo, halogeno-(alcanoílo inferior) tal como 2-halogenoacetilo, em particular 2-cloro-, 2-bromo-, 2-iodo-, 2,2,2-trifluoro- ou 2,2,2-tricloroacetilo, benzoílo facultativamente substituído, por exemplo, com halogénio, alcoxi inferior ou nitro, por exemplo benzoílo, 4-clorobenzoílo, 4-metoxibenzoílo ou 4-nitrobenzoílo, ou (alcoxi inferior)carbonilo ramificado na posição 1 do radical alquilo inferior ou adequadamente substituído nas posições 1 ou 2, em particular t-(alcoxi inferior)carbonilo, por exemplo t-butiloxicarbonilo, arilmetoxicarbonilo com um ou dois radicais arilo que representam de preferência fenilo facultativamente mono- ou polissubstituído, por exemplo com alquilo inferior, por exemplo t-(alquilo inferior) tal como t-butilo, alcoxi inferior tal como metoxi, hidroxi, halogénio, por exemplo cloro e/ou nitro, tal como benziloxicarbonilo facultativamente substituído, por exemplo 4-nitrobenziloxicarbonilo, ou difenilmetoxicarbonilo substituído, por exemplo

benzidriloxicarbonilo ou di-(4-metoxifenil)-metoxicarbonilo, aroilmetoxicarbonilo em que o grupo aroilo representa de preferência benzoilo facultativamente substituído, por exemplo com halogénio tal como bromo, por exemplo fenaciloxicarbonilo, 2-halogeno-(alcoxi inferior)carbonilo, por exemplo 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-bromoetoxicarbonilo ou 2-iodoetoxicarbonilo, ou 2-(sililo trissubstituído)-etoxicarbonilo em que os substituintes representam ambos, independentemente um do outro, um radical hidrocarboneto alifático, aralifático, cicloalifático ou aromático facultativamente substituído (por exemplo substituído com alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, halogénio ou nitro) com um máximo de 15 átomos de C, tal como um dos radicais adequados alquilo inferior, fenil-(alquilo inferior), cicloalquilo ou fenilo facultativamente substituídos, por exemplo 2-tri-(alquil inferior)sililetoxicarbonilo tal como 2-trimetilsililetoxicarbonilo ou 2-(di-n-butil-metil-silil)-etoxicarbonilo, ou 2-triarilsililetoxicarbonilo tal como 2-trifenilsililetoxicarbonilo.

São também radicais acilo adequados como grupos protectores R_1 os radicais apropriados dos ácidos fosfórico, fosfónico ou fosfínico orgânicos, tais como di-(alquil inferior)fosforilo, por exemplo dimetilfosforilo, dietilfosforilo, di-n-propilfosforilo ou di-isopropilfosforilo, dicicloalquilfosforilo, por exemplo diciclohexilfosforilo, difenilfosforilo facultativamente substituído, por exemplo difenilfosforilo ou difenilfosforilo facultativamente substituído com nitro, di-(fenil-[alquil inferior])-fosforilo, por exemplo dibenzilfosforilo ou di-(4-nitrobenzil)-fosforilo, feniloxifenilfosfonilo facultativamente substituído, por exemplo feniloxifenilfosfonilo, di-(alquil inferior)fosfinilo, por exemplo dietilfosfinilo, ou difenilfosfinilo facultativamente substituído, por exemplo difenilfosfinilo.

Os radicais arilo de um grupo arilmetilamino representado por um grupo mono-, di- ou, em particular, trimetilamino são especialmente radicais fenilo facultativamente substituídos. São exemplos destes grupos: benzil-, difenilmetil- e, em particular, tritilamino.

Um grupo mercapto eterificado num grupo amino protegido com um radical deste tipo é primariamente ariltio ou aril-(alquil inferior)tio em que arilo representa, em particular, fenilo facultativamente substituído, por exemplo, com alquilo inferior tal como metilo ou t-metilo, alcoxi inferior tal como metoxi, halogénio tal como cloro, e/ou nitro ou, em particular, um monoéster de ácido carbónico tal como um mono(éster alquílico inferior de ácido carbónico). São grupos protectores adequados: 1-(alcanoil inferior)-prop-1-en-2-ilo, por exemplo 1-acetil-prop-1-en-2-ilo, ou 1-(alcoxi inferior)carbonil-prop-1-en-2-ilo, por exemplo 1-etoxicarbonil-prop-1-en-2-ilo.

São grupos protectores de amino preferidos os radicais acilo de monoésteres de ácido carbónico, em particular t-butiloxicarbonilo, benziloxicarbonilo facultativamente substituído, por exemplo do modo atrás referido, por exemplo 4-nitro-benziloxicarbonilo ou difenilmetoxicarbonilo ou 2-halogeno-(alcoxi inferior)-carbonilo, tal como 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, ou aliloxicarbonilo e grupos protectores relacionados com este último ou, especialmente, 9-fluorenil-metoxicarbonilo.

Os grupos protectores de carboxilo R_2 são normalmente grupos esterificadores, principalmente grupos alquilo inferior ramificados na posição 1 ou adequadamente substituídos nas posições 1 ou 2. São grupos carboxilo esterificados preferidos, entre outros, os seguintes: t-(alcoxi inferior)carbonilo, por exemplo t-butiloxicarbonilo, arilmetoxicarbonilo com um ou dois

radicais arilo, representando este último radicais fenilo facultativamente mono- ou polissubstituídos, por exemplo com alquilo inferior tal como t-(alquilo inferior), por exemplo t-butilo, alcoxi inferior tal como metoxi, hidroxi, halogénio, por exemplo cloro, e/ou nitro, tal como benziloxicarbonilo facultativamente substituído, por exemplo do modo atrás referido, por exemplo 4-metoxibenziloxicarbonilo ou 4-nitrobenziloxicarbonilo, ou difenil-metoxicarbonilo ou di-(4-metoxifenil)-metoxicarbonilo, 1-(alcoxi inferior)-(alcoxi inferior)carbonilo, tal como metoxi-metoxicarbonilo, 1-metoxietoxi-carbonilo ou 1-etoximetoxicarbonilo, 1-(alquil inferior)tio-(alcoxi inferior)carbonilo, tal como 1-metiltiometoxicarbonilo ou 1-etiltioetoxicarbonilo, aroilmetoxicarbonilo em que o grupo aroilo representa benzoilo facultativamente substituído, por exemplo com halogénio, tal como bromo, por exemplo fenaciloxicarbonilo, 2-halogeno-(alcoxi inferior)carbonilo, por exemplo 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-bromoetoxicarbonilo ou 2-iodoetoxicarbonilo ou 2-(silil trissubstituído)--etoxicarbonilo em que os substituintes representam cada um, independentemente dos outros, um radical hidrocarboneto alifático, aralifático, cicloalifático ou aromático facultativamente substituído (por exemplo substituído com alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, halogénio e/ou nitro) tal como apropriados e facultativamente substituídos radicais alquilo inferior, fenil-(alquilo inferior), cicloalquilo ou fenilo, por exemplo 2-tri--(alquil inferior)silil-etoxicarbonilo, 2-trimetilsililetoxicarbonilo ou 2-(di-n-butil-metilsilil)-etoxicarbonilo, ou 2-triarilsililetoxicarbonilo, tal como 2-trifenilsililetoxicarbonilo.

São grupos protectores de carboxilo preferidos: t-(alcoxi inferior)carbonilo, tal como t-butoxicarbonilo e, principalmente, benziloxicarbonilo facultativamente substituído, por exemplo do modo atrás mencionado, tal como

4-nitrobenziloxicarbonilo, ou difenilmetoxicarbonilo e, em especial, 2-(trimetilsilil)-etoxicarbonilo.

Um grupo formador de sais num composto da fórmula I é, por exemplo, um grupo amino livre (R_1=H) ou um grupo carboxilo livre (R_2=H). Os compostos da fórmula I em que R_1 representa hidrogénio podem formar sais de adição de ácido, por exemplo com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, ou com adequados ácidos orgânicos carboxílicos ou sulfónicos, por exemplo ácido trifluoroacético. Os compostos da fórmula I em que R_2 representa hidrogénio podem formar sais metálicos ou de amónio, por exemplo sais de metal alcalino ou sais de metal alcalino-terroso, por exemplo sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio, ou sais com amónia ou aminas orgânicas adequadas, sendo principalmente adequadas para a formação de sais as mono-, di- ou poliaminas primárias, secundárias ou terciárias alifáticas, cicloalifáticas, cicloalifático-alifáticas ou aralifáticas, bem como as bases heterocíclicas, tais como (alquil inferior)aminas, por exemplo trietilamina, hidroxi-(alquil inferior)aminas, por exemplo 2-hidroxietil-amina, bis-(2-hidroxietil)-amina, 2-hidroxietil-dietil-amina ou tri-(2-hidroxietil)-amina, os ésteres alifáticos básicos de ácidos carboxílicos, por exemplo 4-amino-benzoato de 2-dietilaminoetilo, (alquileno inferior)aminas, por exemplo 1-etilpiperidina, cicloalquilaminas, por exemplo diciclohexilamina, ou benzilaminas, por exemplo N,N'-dibenziletilenodiamina, e ainda as bases do tipo piridina, por exemplo piridina, colidina ou quinolina.

Os compostos da fórmula I em que R_1 e R_2 representam hidrogénio podem formar sais internos.

Estes sais podem ser utilizados nomeadamente no isolamento e purificação de compostos da fórmula I em que R_1 e/ou R_2 representam hidrogénio.

Os derivados de ácido carboxílico reactivos de um composto da fórmula I em que R_1 representa hidrogénio são principalmente ésteres activados reactivos ou anidridos reactivos, e ainda amidas cíclicas reactivas.

Os ésteres de ácidos activados são, em particular, ésteres insaturados no que diz respeito ao átomo de carbono de ligação do radical esterificador, por exemplo do tipo do éster vinílico, tal como os próprios ésteres vinílicos (que podem ser obtidos, por exemplo mediante transesterificação de um éster apropriado com acetato de vinilo; método do éster vinílico activado), ésteres carbamoilvinílicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com um reagente isoxazólio; método do 1,2-oxazólio ou método de Woodward), ou ésteres 1-(alcoxi inferior)vinílicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com um (alcoxi inferior)acetileno; método do etoxiacetileno), ou ésteres do tipo amidino tais como ésteres amidino N,N'-dissubstituído (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com uma carbodi-imida N,N'-dissubstituída adequada, por exemplo N,N'-diciclohexil-carbodi-imida; método da carbodi-imida) ou ésteres amidino N,N-dissubstituídos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com uma cianamida N,N-dissubstituída; método da cianamida), ésteres arílicos adequados, em particular ésteres fenílicos adequadamente substituídos, em particular com substituintes que atraem electrões (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com um fenol adequadamente substituído, por exemplo 4-nitrofenol, 4-metilsulfonil-fenol, 2,4,5-triclorofenol,

2,3,4,5,6-pentaclorofenol, 2,3,4,5,6-pentafluorofenol ou 4-fenil-diazofenol, na presença de um agente de condensação tal como N,N-diciclohexil-carbodi-imida; método do éster arílico activado), ésteres cianometílicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com cloroacetonitrilo na presença de uma base; método do éster cianometílico), tioésteres, em particular tioésteres fenílicos facultativamente substituídos, por exemplo com nitro (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com tiofenóis facultativamente substituídos, por exemplo com nitro, nomeadamente mediante o método do anidrido ou da carbodi-imida; método do tioléster activado), ésteres de amino ou de amido (que podem ser obtidos, por exemplo mediante o tratamento do ácido apropriado com um composto N-hidroxi-amino ou N-hidroxi-amido, por exemplo N-hidroxi-succinimida, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, N-hidroxi-piperidina, N-hidroxi-ftalimida, 1-hidroxi-benzotriazole ou 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina, por exemplo mediante o método do anidrido ou da carbodi-imida; método do éster de N-hidroxi activado) ou ésteres silílicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com um agente de sililação, por exemplo hexametildissilazano e que reagem prontamente com hidroxilo mas não com grupos amino).

Os anidridos dos ácidos podem ser simétricos ou, de preferência, ser anidridos mistos desses ácidos, por exemplo, anidridos com ácidos inorgânicos, tais como haletos ácidos, em particular cloretos ácidos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com cloreto de tionilo, pentacloreto de fósforo ou cloreto de oxalilo; método do cloreto ácido), azidas (que podem ser obtidas, por exemplo, a partir de um éster de um ácido apropriado por intermédio da correspondente hidrazida e do tratamento desta com ácido nitroso; método da

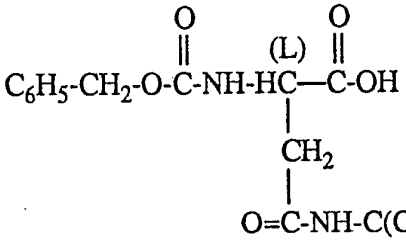
azida), anidridos com mono-derivados de ácido carbónico, tal como com ésteres apropriados, por exemplo mono-ésteres (alquil inferior)icos de ácido carbónico (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do correspondente ácido com (alquil inferior)-halogeno-, tal como cloroformiatos, ou com 1-(alcoxi inferior)carbonil-2-(alcoxi inferior)-1,3-di-hidro-quinolina, por exemplo 1-(alcoxi inferior)carbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina; método do anidrido misto O-alquil-carbónico), ou anidridos com ácido fosfórico di-halogenado, em particular diclorinado (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido correspondente com oxicloreto de fósforo; método do oxicloreto de fósforo), ou anidridos com ácidos orgânicos, tais como anidridos mistos com ácidos orgânicos carboxílicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com um haleto de (alcano inferior)- ou fenilalcanocarbonilo, por exemplo cloreto de fenilacetilo, de pivaloílo ou de trifluoroacetilo; método do anidrido misto carboxílico), ou com ácidos orgânicos sulfónicos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante o tratamento de um sal, tal como um sal de metal alcalino, do ácido apropriado com um haleto de sulfonilo orgânico adequado, tal como cloreto de alcano inferior ou de arilo, por exemplo de metano ou de p-toluenossulfonilo; método do anidrido misto sulfónico), bem como anidridos simétricos (que podem ser obtidos, por exemplo, mediante condensação do ácido apropriado na presença de uma carbodi-imida ou de 1-dietilaminopropina; método do anidrido simétrico).

São amidas cíclicas adequadas, em particular, as amidas com compostos cíclicos diaza com 5 membros de natureza aromática, tais como amidas com imidazoles, por exemplo imidazole (que podem ser obtidas, por exemplo, mediante o tratamento do ácido apropriado com N,N'-carbonildi-imidazole; método da imidazolida) ou pirazoles, por exemplo 3,5-dimetil-pirazole (que pode ser obtido,

por exemplo, por intermédio da hidrazida ácida mediante o tratamento desta com acetilacetona; método da pirazolida).

As abreviaturas dos aminoácidos usadas no presente texto são as usuais: Asp designa ácido aspártico, Asn designa asparagina, Gln designa glicina, Ser designa serina, Leu designa leucina, Gli designa glicina, Lis designa lisina, His designa histidina, Pro designa prolina, Tir designa tirosina, Trp designa triptofano, Arg designa arginina, Val designa valina e Ile designa isoleucina.

Em conformidade com as regras de nomenclatura internacionalmente reconhecidas, as abreviaturas dos aminoácidos usadas no presente texto, por exemplo as abreviaturas atrás mencionadas, designam o ácido livre e, salvo menção em contrário, a configuração L. O grupo α-amino deve ser considerado como estando situado à esquerda da abreviatura e o grupo carboxilo como estando situado à direita da abreviatura. A ausência de um átomo H no grupo α-amino é indicada por meio de um traço à esquerda da abreviatura do aminoácido e a ausência de dois átomos H é indicada por meio de dois traços à esquerda da abreviatura. A ausência de um grupo HO no grupo carboxilo é indicada por meio de um traço à direita da abreviatura. Os substituintes da cadeia lateral de aminoácidos são colocados entre parênteses imediatamente após o símbolo do aminoácido. Por exemplo, Z-Asn(Trt)-OH designa o composto da fórmula (Ia).



(Ia)

As vantagens inerentes à utilização dos compostos da fórmula I na síntese de peptídeos são ilustradas na secção dos Exemplos da presente memória descritiva. A título de exemplo, H-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Ser-Leu-Gli-OH é obtido sob a forma de produto bruto com uma pureza de 92% quando o grupo carbamoílo dos resíduos de Gln é protegido com tritilo no decurso da preparação. Sem esta protecção no decurso da síntese de Merrifield, o produto bruto apenas conterá 30% do produto desejado e não 92% como anteriormente.

Os produtos brutos obtidos a partir das sínteses de Fmoc-Lis-Gln-Asn-Pro-Lis-Tir-Gln-Trp-Asn-OH, estando os grupos carbamoílo de Asn e Gln protegidos com tritilo (produto bruto A) e com 2,4,6-trimetoxi-benzilo (produto bruto B) contêm cerca de 95% do produto desejado, no caso do produto bruto A, e apenas cerca de 8% do produto desejado, no caso do produto bruto B.

Os compostos da fórmula I podem ser usados como unidades estruturais na síntese de quaisquer peptídeos desejados que contenham resíduos de glutamina e/ou de asparagina ou como intermediários para a preparação destas unidades estruturais. Na síntese de peptídeos de Merrifield usam-se aqueles compostos da fórmula I em que R_1 representa um grupo protector de amino tal como, em particular, 9-fluorofenil-metoxicarbonilo ou

t-butiloxicarbonilo, R_2 representa hidrogénio e R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo e os seus derivados de ácido carboxílico reactivos.

São compostos preferidos da fórmula I aqueles em que R_1 representa benziloxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, aliloxicarbonilo ou t-butiloxicarbonilo, R_2 representa hidrogénio e R_3 representa trifenilmetilo.

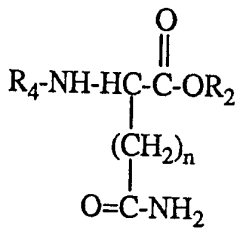
São compostos particularmente preferidos da fórmula I os que se encontram descritos nos Exemplos.

Entre os derivados de ácido carboxílico precedentemente descritos em pormenor, são particularmente dignos de menção os ésteres 2,4,5-tricloro-fenílicos, os ésteres pentafluoro-fenílicos, os ésteres com 1-hidroxibenzotriazole, com 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina ou os anidridos, especialmente aqueles derivados de ácido carboxílico reactivos dos compostos da fórmula I anteriormente assinalados como sendo preferidos.

Surpreendentemente, o grupo protector de amida R_3 de acordo com o presente invento é estável no decurso da hidrogenação catalítica sob condições em que o benziloxicarbonilo ou R_3 como grupo protector de amino ou benzilo como grupo protector de carboxilo já teriam sido eliminados. O grupo protector R_3 pode ser eliminado, por exemplo, com (ácido trifluoroacético)/água/-1,2-etanoditiol (90:5:5) a uma temperatura situada entre a temperatura ambiente e +50°C, por exemplo a +30°C.

Os compostos da fórmula I são preparados por um processo em si conhecido. O processo de preparação de acordo com o presente invento caracteriza-se por

a) se fazer reagir um composto da fórmula II,



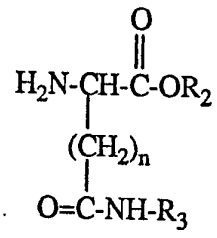
(II)

em que R_4 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino estável sob as condições de reacção e n e R_2 têm os significados atrás mencionados, com um composto da fórmula III,

$$R_3\text{-}OH \qquad \text{(III)}$$

em que R_3 tem o significado atrás mencionado, e se eliminam aqueles grupos protectores que não fazem parte do produto final da fórmula I desejado do produto resultante, ou

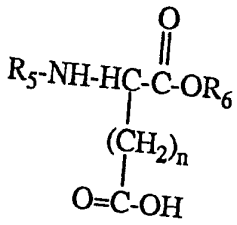
b) no caso de se pretender preparar um composto da fórmula I em que R_1 representa um grupo protector de amino, se introduzir um grupo protector de amino num composto da fórmula geral IV,



(IV)

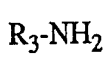
em que n, R_2 e R_3 têm os significados atrás mencionados, ou

c) se fazer reagir um composto da fórmula V,



(V)

em que n tem o significado atrás mencionado, R_5 representa um grupo protector de amino estável sob as condições de reacção e R_6 representa um grupo protector de carboxilo estável sob as condições de reacção, com um composto da fórmula VI,



(VI)

em que R_3 tem o significado atrás mencionado, e se eliminam aqueles grupos protectores que não fazem parte do produto final da fórmula I desejado do produto resultante

e, se desejado, após a realização de um dos processos a), b) ou c), se converte um composto resultante da fórmula I contendo um grupo formador de sais num seu sal, ou se converte um sal resultante no seu composto livre, ou se converte um composto resultante da fórmula I em que R_2 representa hidrogénio num seu derivado de ácido carboxílico reactivo.

Estas variantes do processo mencionadas serão presentemente explicadas em pormenor:

Processo a):

O processo a) é realizado num solvente orgânico adequado, tal como, por exemplo, ácido acético, na presença de uma quantidade catalítica de um ácido de Lewis forte tal como, por exemplo, trifluoreto de boro, ácido trifluorometanossulfónico ou, de preferência, ácido sulfúrico e na presença de um agente de desidratação, tal como, por exemplo, anidrido acético, a uma temperatura situada entre cerca de 0°C e +100°C, de preferência entre a temperatura ambiente (cerca de 20°C) e +70°C, por exemplo a +50°C. Quando R_4 representa hidrogénio, é vantajoso utilizar uma quantidade de ácido sulfúrico anidro superior à usada no caso em que R_4 representa um grupo protector de amino, por exemplo 1,1 equivalentes, e a reacção é realizada de preferência a cerca de + 60°C, especialmente quando R_4 representa hidrogénio e n representa 1 nos compostos de partida da fórmula II.

Um grupo protector de amino R_4 é um grupo protector de amino estável sob condições acídicas, tal como, por exemplo, aliloxicarbonilo, trifluoroacetilo ou, de preferência, benziloxicarbonilo ou 9-fluorenil-metoxicarbonilo.

Quando R_1 e/ou R_2 representam hidrogénio no produto final da fórmula I desejado, torna-se necessário eliminar os grupos protectores R_4 e/ou R_2.

A maior parte dos grupos protectores de carboxilo R_2 já foram eliminados sob as condições de reacção. Os únicos grupos protectores de carboxilo R_2 estáveis são, por exemplo, metilo, etilo ou alilo, que podem ser eliminados, por exemplo, mediante hidrólise catalisada por bases.

O grupo protector de amino R_4 representado por trifluoroacetilo é eliminado por meio de hidrólise em meio fracamente

alcalino, por exemplo com solução aquosa de amónia, hidróxido de sódio ou bário ou com resinas de permuta iónica básicas.

O grupo protector de amino R_4 representado por benziloxicarbonilo é eliminado por meio de hidrogenação na presença do catalisador paládio sobre carbono em solução metanólica de ácido cloridrico à temperatura ambiente e sob pressão atmosférica.

O grupo protector de amino R_4 representado por 9-fluorenil-metoxicarbonilo é eliminado com piperidina/dimetilacetamida (1:4) à temperatura ambiente.

O rendimento do processo a) situa-se entre 60% e 95% do valor teórico.

Processo b):

O processo b) é realizado num solvente orgânico, facultativamente aquoso, adequado, ou numa mistura de solventes deste tipo, a uma temperatura situada entre 0°C e cerca de +80°C, de preferência a uma temperatura situada entre a temperatura ambiente e +50°C, podendo também ser realizado em suspensão. Assim, por exemplo, o 9-fluorenil-metoxicarbonilo pode ser introduzido como grupo protector de amino R_1 por meio da reacção de um composto de partida da fórmula IV num solvente orgânico tal como tetrahidrofurano ou dioxano, na presença de água e de uma base inorgânica, tal como bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio e, se necessário, de uma amina orgânica terciária, tal como trietilamina, com carbonato de 9-fluorenilmetil N-succinimidilo. O grupo protector de amino R_1 t-butiloxicarbonilo pode ser introduzido, por exemplo, em solução aquosa de tetrahidrofurano a 90%, na presença de trietilamina à temperatura ambiente com uma

quantidade equimolar de di carbonato de di-t-butilo. O rendimento do processo b) situa-se entre 90% e 99% do valor teórico.

Contrariamente ao processo a), o processo b) permite a introdução de todo e qualquer grupo protector de amino R_1 desejado.

Processo c):

O processo c) é realizado num solvente orgânico adequado, tal como 1,2-dicloroetano, a uma temperatura situada entre -20°C e +70°C, por exemplo a 0°C, e preferencialmente sob uma atmosfera de gás protector, por exemplo sob uma atmosfera de árgon. Para tal é necessária uma activação in situ do grupo carboxilo livre no composto de partida da fórmula V, por exemplo com o auxílio de 1-cloro-N,N,2-trimetil-prop-1-enilamina. O rendimento do processo c) situa-se entre 40% e 70% do valor teórico.

Um exemplo de um grupo protector de amino R_5 que é estável sob as condições de reacção é o grupo 9-fluorenil-metoxicarbonilo. Um exemplo de um grupo protector de carboxilo R_6 estável sob as condições de reacção é o grupo benzilo.

Os grupos protectores de carboxilo e/ou de amino que não fazem parte do produto final da fórmula I desejado são eliminados por processos em si conhecidos, por exemplo mediante solvólise, em particular hidrólise, alcoólise ou acidólise, ou por meio de redução, em particular hidrogenólise ou redução química, quando apropriado em passos sucessivos ou simultaneamente, sendo igualmente possível a utilização de métodos enzimáticos.

Em particular, um grupo benzilo R_6 pode ser eliminado por meio de hidrogenação na presença de um catalisador paládio sobre carbono à temperatura ambiente, caso em que são mantidos o grupo 9-fluorenil-metoxicarbonilo R_5 e o grupo protector R_3. O grupo 9-fluorenil-metoxicarbonilo R_5 pode ser eliminado da forma descrita no processo a). O rendimento da eliminação dos grupos protectores situa-se entre cerca de 90% e cerca de 99% do valor teórico.

Os compostos da fórmula I são preferencialmente preparados pelo processo b) e, em especial, pelo processo a).

Operações adicionais:

Os sais dos compostos da fórmula I contendo grupos formadores de sais podem ser preparados por um processo em si conhecido. Assim, os sais dos compostos da fórmula I contendo grupos ácidos podem ser obtidos por meio da reacção de uma base adequada, por exemplo mediante o tratamento com um composto metálico adequado tal como um sal de metal alcalino de um ácido orgânico carboxílico adequado, por exemplo o sal de sódio do ácido 2-etil-capróico, ou com um sal inorgânico de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso, em particular se derivar de um ácido fraco e de preferência volátil, por exemplo bicarbonato de sódio, ou com amónia ou com uma amina orgânica adequada, caso em que se usa, de preferência, uma quantidade estequiométrica ou apenas um pequeno excesso do agente formador de sais. Os sais de adição de ácido dos compostos da fórmula I são obtidos da forma usual, por exemplo por meio do tratamento com um ácido ou com um reagente de permuta aniónica adequado. Os sais internos dos compostos da fórmula I) que contêm, por exemplo, um grupo carboxilo livre e um grupo amino livre, podem ser obtidos, por exemplo, mediante a neutralização de sais, tais como sais de adição

de ácido, até atingirem o ponto isoeléctrico, por exemplo com bases fracas, ou por meio do tratamento com agentes de permuta iónica líquidos. A formação de sais tem lugar de uma forma virtualmente quantitativa.

Os sais podem ser convertidos de uma forma virtualmente quantitativa nos respectivos compostos livres pelos processos usuais, sendo-o os sais metálicos e de amónio mediante, por exemplo, do tratamento com ácidos adequados e os sais de adição de ácido por meio do tratamento com um agente básico adequado.

Os derivados de ácido carboxílico reactivos de um composto da fórmula I em que R_2 representa hidrogénio podem ser preparados da forma atrás descrita aquando da caracterização dos derivados de ácido carboxílico reactivos. Para alcançar este objectivo, pode partir-se de um composto da fórmula I em que R_1 representa um grupo protector de amino adequado e R_2 representa hidrogénio. O rendimento situa-se entre cerca de 85% e cerca de 98% do valor teórico no que se refere a ácido carboxílico reactivo.

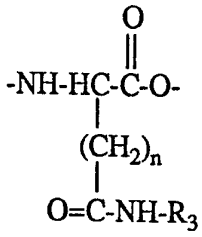
Os processos atrás descritos, incluindo os processos para a eliminação de grupos protectores e as medidas processuais adicionais, são realizados, salvo menção em contrário, de forma em si conhecida, por exemplo na presença ou ausência de solventes e diluentes preferencialmente inertes, se necessário na presença de agentes de condensação ou catalisadores, a uma temperatura reduzida ou elevada, por exemplo a uma temperatura situada entre cerca de -20°C e cerca de 150°C, em particular entre cerca de 0°C e cerca de +70°C, de preferência entre cerca de +10°C e a temperatura ambiente e especialmente a esta última temperatura, num recipiente adequado e, se necessário, numa atmosfera de gás inerte, por exemplo azoto.

Isto implicará a utilização, tendo em conta todos os substituintes presentes na molécula, se necessário, por exemplo na presença de radicais facilmente hidrolisáveis, de condições de reacção especialmente suaves, tais como tempos de reacção curtos, utilização de baixas concentrações de agentes fracamente acídicos ou básicos, a utilização de quantidades estequiométricas, escolha de catalisadores, solventes e condições de temperatura e/ou pressão adequados.

O presente invento diz também respeito àquelas formas de execução do processo que partem de um composto obtido como intermediário em qualquer um dos estádios do processo e o submetem aos passos do processo restantes, ou em que o processo é interrompido em qualquer um dos seus estádios intermédios, ou em que um composto de partida é obtido sob as condições de reacção ou usado sob a forma de um seu derivado reactivo ou sal. Isto implicará, de preferência, a utilização daqueles compostos de partida que, submetidos ao processo, dão origem aos compostos precedentemente descritos como particularmente úteis.

O presente invento diz igualmente respeito à utilização de compostos da fórmula I, em particular à utilização daqueles compostos da fórmula I em que R_1 representa um grupo protector de amino tal como benziloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo ou, em particular, 9-fluorenil-metoxicarbonilo, R_2 representa hidrogénio e R_3 representa 4-monometoxitritilo, 4,4'-dimetoxitritilo ou, em particular, trifenilmetilo (tritilo), e à utilização de derivados de ácido carboxílico reactivos destes compostos na síntese de peptídeos, especialmente na fase sólida, por exemplo para a síntese de Merrifield.

O presente invento diz ainda respeito a substâncias que contêm pelo menos um radical bivalente da fórmula VII,



(VII)

em que n representa 1 ou 2 e R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo, a um processo para a sua preparação e à sua utilização na síntese de peptídeos. Estas substâncias são essencialmente derivados de peptídeos tais como os produzidos sob a forma de intermediários, por exemplo, na síntese de peptídeos. Em conformidade, estes derivados de peptídeos também podem ser ligados a uma resina sintética.

Os Exemplos subsequentes ilustram o presente invento sem limitarem o seu âmbito. A unidade das temperaturas indicadas é o grau Celsius.

Abreviaturas:

But	= t-butilo
Boc	= t-butoxicarbonilo
Bzl	= benzilo
Dhbt	= 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazinilo
EM-BAR	= Espectro de massa de bombardeamento atómico rápido
Fmoc	= 9-fluoranil-metoxicarbonilo
CLAP	= cromatografia líquida sob alta pressão
conc.	= concentrado
Pfp	= pentafluorofenilo
Pmc	= 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
p.f.	= ponto de fusão
Tcp	= 2,4,5-triclorofenilo
THF	= tetrahidrofurano
Tmob	= 2,4,6-trimetoxi-benzilo
Trt	= tritilo (trifenil-metilo)
Z	= benziloxicarbonilo

Exemplo 1: Z-Asn(Trt)-OH

Agita-se uma mistura de 13,3 g de Z-Asn-OH (50 mmol), 26 g de trifenilmetanol (100 mmol), 150 ml de ácido acético e 9,5 ml (100 mmol) de anidrido acético a 50° durante 15 minutos. A adição de 0,25 ml de ácido sulfúrico conc. dá origem, passados 5 minutos, a uma solução amarela transparente. Após 1 1/2 hora, a solução é arrefecida e vertida para dentro de 1,5 l de água-gelo. O precipitado obtido é retirado por filtração, exaustivamente lavado com água e dissolvido em cerca de 500 ml de acetato de etilo. A fase orgânica é lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, secada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida até a sua massa ser 250 g. Induz-se a

cristalização de Z-Asn(Trt)-OH mediante a adição de 125 ml de hexano, p.f.=195-196°.

Exemplo 2: H-Asn(Trt)-OH

Hidrogena-se uma suspensão de 10,2 g de Z-Asn(Trt)-OH (20 mmol) em 120 ml de metanol e 20 ml de ácido cloridrico aquoso 1N na presença de 0,5 g de um catalisador paládio sobre carbono a 10% à temperatura ambiente e sob pressão atmosférica. Uma vez completada a absorção de hidrogénio, o catalisador é retirado por filtração e exaustivamente lavado com metanol, e o filtrado é concentrado sob pressão reduzida até a sua massa estar reduzida a 100 g. A adição de 2,8 ml de trietilamina (20 mmol) é seguida de nova concentração até a massa estar reduazida a 50 g e o precipitado cristalino é retirado por filtração e lavado com uma mistura 1:1 de metanol e água e depois com água até estar isento de cloreto. O H-Asn(Trt)-OH contém 0,5 mol de água e decompõe-se lentamente a temperaturas superiores a 220°.

Exemplo 3: Fmoc-Asn(Trt)-OH

Adicionam-se 3,4 g de carbonato de 9-fluorenilmetil N-succinimidilo (10 mmol) e, simultaneamente e gota a gota, de modo a que o pH passe a ter um valor entre 8,3 e 8,7, 1,4 ml de trietilamina a uma solução vigorosamente agitada de 3,8 g de H-Asn(Trt)-OH·0,5H_2O (10 mmol) em 20 ml de tetrahidrofurano, 10 ml de água e 1,4 ml de trietilamina (10 mmol). Passados 20 minutos, a mistura é arrefecida num banho de gelo e são-lhe adicionados acetato de etilo e 25 ml de uma solução aquosa 1M de bissulfato de potássio. A fase orgânica é lavada com água até estar isenta de sulfato, secada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida até a sua massa estar reduzida a 50 g.

O Fmoc-Asn(Trt)-OH pode ser cristalizado mediante a lenta adição de éter isopropílico. P.f.=210-211° (com decompisição).

Exemplo 4: Fmoc-Asn(Trt)-OH

Agita-se uma suspensão de 3,54 g de Fmoc-Asn-OH (10 mmol) e 5,2 g de trifenilmetanol (20 mmol) em 30 ml de ácido acético e 1,9 ml de anidrido acético (20 mmol) a 50° durante 15 minutos e, em seguida, adiciona-se-lhe uma solução de 0,05 ml de Ácido sulfúrico conc. em 5 ml de ácido acético. Após cerca de uma hora à temperatura de 50° obtém-se uma solução e, após 1 1/2 hora começa a formar-se um precipitado. Passadas 3 horas, adicionam-se lentamente à suspensão 200 ml de água gelada, sob arrefecimento em gelo, agita-se brevemente a mistura e o precipitado é retirado por filtração e exaustivamente lavado com água. O material húmido é dissolvido em acetato de etilo e a fase orgânica é lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, secada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida. Antes do produto começar a isolar-se, ao cristalizar, a solução é diluída com 1,2-dicloroetano, novamente concentrada e filtrada através de 50 g de gel de sílica. O excesso de trifenilmetanol é eluído com 200 ml de 1,2-dicloroetano e, em seguida, o Fmoc-Asn(Trt)-OH é eluído com duas porções de 500 ml, uma de uma mistura 98:2 e outra de uma mistura 96:4, de 1,2-diclorometano e metanol. O resíduo resultante da evaporação até à secura é dissolvido em 10 ml de tetrahidrofurano, à solução são adicionados 30 ml de acetato de etilo, a solução é concentrada até a sua massa estar reduzida a 20 g e adiciona-se éter di-isopropílico para provocar a cristalização. O Fmoc-Asn(Trt)-Oh obtido desta forma funde a uma temperatura situada entre 210 e 211° (com decomposição).

Exemplo 5: Fmoc-Asn(Trt)-OH

Hidrogena-se uma solução de 0,69 g de Fmoc-Asn(Trt)--OBzl em 10 ml de uma mistura 9:1 de metanol e água na presença de 0,07 g de catalisador paládio sobre carbono a 10%, à temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, até que o composto de partida já não seja visível no cromatograma em camada fina (solvente: mistura 1:1 de tolueno e acetona). O filtrado é evaporado após remoção do catalisador por filtração e o resíduo é dissolvido numa mistura 96:4 de 1,2-dicloroetano e metanol e filtrado através de uma pequena quantidade de gel de sílica. A evaporação do solvente dá origem a Fmoc-Asn(Trt)-OH, p.f.=210--211° (com decomposição).

O composto de partida pode ser obtido do seguinte modo:

Etapa 5.1: Suspendem-se 1,12 g de H-Asp-OBzl (5 mmol) e 1,05 g de bicarbonato de sódio em 25 ml de uma mistura 9:1 de dioxano e água, adicionam-se à suspensão 1,85 g de carbonato de 9-fluorofenil N-succinimidilo e agita-se a mistura à temperatura ambiente durante 15 horas. A solução é concentrada e depois diluída com acetato de etilo, a fase orgânica é lavada com solução aquosa 0,5M de bissulfato de sódio e água e, em seguida, secada sobre sulfato de sódio e concentrada. O Fmoc-Asp-OBzl separa-se, cristalizando, após a adição de éter de petróleo.

Etapa 5.2: Adicionam-se 0,8 ml de 1-cloro-N,N,2-trimetil-prop-1-enilamina (A. Devos e outros, J. Chem. Soc., Chem. Commun., vol. 1979, p. 1180) a uma solução agitada de 2,09 g de Fmoc-Asp-OBzl em 20 ml de 1,2 dicloroetano a 0° sob uma atmosfera de árgon. Passados 10 minutos, adiciona-se uma solução de 1,2 g de trietilamina em 4 ml de 1,2-dicloroetano, e, em seguida, agita-se a mistura durante 2 horas, dilui-se com acetato de etilo

e lava-se com água. A fase orgânica é secada e evaporada. O resíduo é dissolvido em clorofórmio e cromatografado sobre 250 g de gel de sílica. As fracções contendo o Fmoc-Asn(Trt)-OBzl são combinadas e evaporadas; o produto é obtido sob a forma de uma espuma amorfa.

Exemplo 6: Z-Gln(Trt)-OH

Adiciona-se 1.1 ml de anidrido acético (12 mmol) a uma mistura de 2,8 g de Z-Gln-OH (10 mmol), 5,2 g de trifenilmetanol (20 mmol) em 30 ml de ácido acético e agita-se a mistura a 50° durante 15 minutos. Em seguida, adiciona-se 0,05 ml de ácido sulfúrico conc. (cerca de 1 mmol), obtendo-se uma solução amarela transparente após alguns minutos. Passadas 2 horas, a solução é adicionada gota a gota a 500 ml de água, sob agitação e arrefecimento em gelo, e o precipitado é retirado por filtração e exaustivamente lavado com água. O material húmido é dissolvido em acetato de etilo, a fase aquosa é retirada e a fase orgânica é lavada uma única vez com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, secada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida até a sua massa ser 20 g. A cristalização do Z-Gln(Trt)-OH é provocada por meio da adição de hexano em porções. P.f.=161-162°.

Exemplo 7: H-Gln(Trt)-OH

Hidrogena-se uma suspensão de 10,4 g de Z-Gln(Trt)-OH (20 mmol) em 180 ml de uma mistura 9:1 de metanol e água e 20 ml de ácido clorídrico aquoso 1N à temperatura ambiente, sob pressão atmosférica e na presença de 0,5 g de catalisador paládio sobre carbono a 10%. Uma vez completada a absorção de hidrogénio, o composto de partida encontra-se dissolvido. O catalisador é retirado por filtração e lavado com metanol. O filtrado é

concentrado até a sua massa ser 200 g e adicionam-se-lhe, a 60°, 2,8 ml de trietilamina (20 mmol) após o que o produto começa imediatamente a cristalizar. A mistura é concentrada até a sua massa estar reduzida a 100 g, deixada em repouso, a cerca de 4°, durante algum tempo e os cristais são retirados por filtração e lavados com uma mistura de metanol e água até estarem isentos de cloreto. O H-Gln(Trt)-OH obtido desta forma contém 0,5 mol de água e funde a 233° (com decomposição).

Exemplo 8: Fmoc-Gln(Trt)-OH

Adiciona-se 3,4 g de carbonato de 9-fluorenilmetil N-succinimidilo (10 mmol) e, simultaneamente e gota a gota, de modo a que o pH passe a ter o valor 8,5, 1,4 ml de trietilamina a uma solução vigorosamente agitada de 4 g de hemi-hidrato de H-Gln(Trt)-OH (10 mmol) em 20 ml de tetrahidrofurano e 10 ml de solução aquosa 1N de hidróxido de sódio. Passados 20 minutos, a mistura é arrefecida num banho de gelo, coberta com uma camada de acetato de etilo e acidificada, até o seu pH atingir um valor entre 2 e 2,5, com 25 ml de solução aquosa 1M de bissulfato de potássio. A fase orgânica é lavada com água até à neutralidade, seca sobre sulfato de sódio e concentrada até à secura sob pressão reduzida até a sua massa estar reduzida a 30 g. A cristalização do produto é induzida por meio da adição, em porções, de 35 ml de éter di-isopropílico. Após um prolongado período de repouso no frio, o material cristalino é retirado por filtração e lavado uma única vez com uma mistura 1:4 de acetato de etilo e éter isopropílico e três vezes com éter di-isopropílico. O Fmoc-Gln(Trt)-OH ainda contém 0,5 mol de éter di-isopropílico, mesmo após prolongada secagem a 60° sob vácuo. P.f. superior a 125° (fusão lenta com perda de éter di-isopropílico).

Exemplo 9: Fmoc-Gln(Trt)-OH

Agita-se a 100° durante 10 minutos uma mistura de 7,4 g de Fmoc-Gln-OH (20 mmol) e 10,4 g de trifenilmetanol (40 mmol) em 300 ml de ácido acético. Adiciona-se 0,1 ml de ácido sulfúrico conc. e agita-se a 100° durante mais 15 minutos com o propósito de se obter uma solução amarela transparente. Esta solução é evaporada a 60° sob pressão reduzida e o resíduo é então secado sob pressão reduzida durante 10 minutos. O resíduo sólido é dissolvido em 60 ml de ácido acético a 60° durante 20 minutos, adicionam-se-lhe, em seguida, 2 ml de anidrido acético (20 mmol) e, após 1 hora a 60°, a mistura é evaporada sob pressão reduzida. O resíduo oleoso é secado a 60° durante 10 minutos, dissolvido, em seguida, em 100 ml de ácido acético e adicionado gota a gota a 500 ml de água. O precipitado é retirado por filtração, exaustivamente lavado com água e dissolvido em acetato de etilo. A fase aquosa é retirada e a fase orgânica é lavada com solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica é secada sobre sulfato de sódio e, em seguida, evaporada até à secura. O resíduo é dissolvido em 50 ml de 1,2-dicloroetano e aplicado sobre 100 g de gel de sílica. A eluição com 1,2-dicloroetano e 1,2-dicloroetano contendo 2%, e depois 4%, de metanol. As fracções contendo Fmoc-Gln(Trt)-OH são evaporadas sob pressão reduzida e o produto é cristalizado a partir de uma mistura de acetato de etilo e éter di-isopropílico. P.f. superior a 125°.

Exemplo 10: H-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Ser-Leu-Gly-OH

O peptídeo é preparado de duas formas, ambas aplicando a síntese de Merrifield em fase sólida, a partir de Fmoc-Gln-OH, numa delas, e a partir de Fmoc-Gln(Trt)-OH, na outra.

A molécula de peptídeo é preparada no decurso de uma síntese de Merrifield a partir de 1 g daquilo que se designa por (resina poliestireno)-(éster p-benziloxibenzílico de Fmoc-Gli) (com 1% de ligações cruzadas), adquirido a Novabiochem, Laufelfingen, Suiça, em que o grupo carboxilo da glicina, cujo grupo amino está protegido com 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc), se encontra esterificado com álcool 4-metoxi-benzílico, estando o átomo de carbono do grupo metoxi ligado a um anel aromático da resina poliestireno que tem 1% de ligações cruzadas com divinilbenzeno e serve, simultaneamente, como material de suporte. Isto implica a utilização de um aparelho de síntese de peptídeos automático que é adequado para a eliminação alternada dos grupos protectores de amino, no caso presente, o grupo Fmoc, e para o acoplamento com os compostos aminoácidos protegidos com N-Fmoc. Como consequência, no primeiro passo o grupo protector Fmoc no (éster p-benziloxibenzílico de Fmoc-Gli)-(resina poliestireno) é removido e o Fmoc-Leu-OH é acoplado ao (éster p-benziloxibenzílico de H-Gli)-(resina poliestireno) obtido deste modo, e, em seguida, os outros N-Fmoc-aminoácidos são acoplados, por etapas, na sequência Fmoc-Ser(But)-OH e depois ou em Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln-OH e Fmoc-Gln-OH ou em Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH e Fmoc-Gln(Trt)-OH ao intermediário peptídeo/resina obtido em cada um dos casos. Cada uma das etapas é realizada de acordo com o esquema adiante apresentado, utilizando cerca de 10 ml de líquido de lavagem em cada um dos casos, efectuando cada uma das operações à temperatura ambiente, salvo menção em contrário, e agitando regularmente a mistura de reacção em cada um dos casos:

Partindo de 1 g do material de partida Fmoc-Gli/resina atrás referido (carga: 0,47 mmol/g) realizaram-se os seguintes passos do processo, repetindo cada um:

1. uma única lavagem com isopropanol durante 0,8 minuto;

2. três lavagens, cada uma durante 0,5 minuto cada uma, com dimetilacetamida desgaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

3. cinco tratamentos, cada um durante 1,7 minuto, com uma mistura 1:4 de piperidina e dimetilacetamida (eliminação do grupo protector de Fmoc);

4. uma única lavagem com isopropanol durante 0,8 minuto;

5. cinco lavagens, cada uma durante 0,5 minuto, com dimetilacetamida desgaseificado sob pressão reduzida (isento de dimetilamina);

6. uma única lavagem com isopropanol durante 0,8 minuto;

7. três tratamentos, cada um durante 1,7 minuto, com uma mistura 1:4 de piperidina e dimetilacetamida (com o propósito de eliminar completamente o grupo protector de Fmoc);

8. duas lavagens, cada uma durante 0,5 minuto, com dimetilacetamida desgaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

9. uma única lavagem com isopropanol durante 0,8 minuto;

10. seis lavagens, cada uma durante 0,5 minuto, com dimetilacetamida desgaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

11. adição do reagente de acoplamento que foi preparado entretanto (obtido do seguinte modo: deixa-se à temperatura ambiente durante 30 minutos uma mistura de 1,4 mmol de 1-hidroxi-1H-benzotriazole e 1,55 mmol de di-isopropilcarbo-di-imida em 4 ml de dimetilacetamida (isenta de dimetilamina) e depois utiliza-se). A reacção de acoplamento propriamente dita demora 60 minutos à temperatura ambiente.

12. uma única acetilação com uma mistura 1:1:8 de anidrido acético, piridina e dimetilacetamida (isenta de dimetilamina) durante 5 minutos;

13. três lavagens, cada uma durante 0,5 minuto, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamino);

14. uma única lavagem com isopropanol durante 0,8 minuto e

15. duas lavagens, cada uma durante 0,5 minuto, com dimetilacetamido desgaseificado sob pressão reduzida (isento de dimetilamina).

Os rendimentos de cada um dos cinco últimos passos de acoplamento com Fmoc-Gln-OH ou Fmoc-Gln(Trt)-OH são determinados a partir da 1-(9-fluorenilmetil)-piperidina obtida como produto secundário em cada eliminação do grupo Fmoc. Com este propósito, dilui-se cada um dos filtrados combinados obtidos nos passos 3 a 10 até perfazer um determinado volume e submetem-se a fotometria por UV ($lambda_{máx}$=299,8 nm, ϵ=7800). Os rendimentos da série com Fmoc-Gln-OH são 99%, 97%, 98%, 49% e 72% e os rendimentos da série com Fmoc-Gln(Trt)-OH são 100%, 100%, 99%, 99% e 100%.

O peptídeo é eliminado da resina por meio do tratamento desta com 10 ml de uma mistura 90:5:5 de ácido trifluoroacético, água e 1,2-etanoditiol durante 8 minutos. A mistura de reacção é filtrada, o filtrado é concentrado sob pressão reduzida e o peptídeo é precipitado com auxílio de uma mistura 1:1 de éter di-isopropílico e hexano e secado. O tratamento atrás referido com (ácido trifluoroacético)/água/1,2-etanoditiol, em si, também origina uma eliminação parcial dos grupos tritilo (quando estes se encontram presentes) e do grupo t-butilo. Esta eliminação é completada mediante o aquecimento do precipitado peptídeo em (ácido trifluoroacético)/água/1,2-etanoditiol (90:5:5) a 30° durante 30 minutos. Os produtos brutos resultantes da síntese com e sem grupos protectores tritilo são submetidos a CLAP (coluna: Nucleosil 5C18, 250 mm x 4,6 mm; fase móvel: A = ácido trifluoroacético a 0,1% em água; B = ácido acético a 0,1% em acetonitrilo; gradiente: 0 a 40% de B em 30 minutos; caudal: 1 ml/minuto; detecção: 215 nm).

O produto em epígrafe desejado tem um tempo de retenção de 17,98 minutos. O perfil CLAP do produto bruto obtido na síntese com protecção com tritilo dos resíduos glutamina apresenta um sinal (8%) para o tempo de retenção de 18,65 minutos além do composto em epígrafe (92%). O perfil CLAP do produto bruto obtido na síntese sem protecção com tritilo dos resíduos glutamina apresenta um sinal (70%) para um tempo de retenção de 18,38 minutos além do composto em epígrafe (apenas 30%).

Exemplo 11: H-Arg-Arg-Ser-Asn-Gln-Val-Ser-Gln-Asn-Tir-Pro-Ile--Val-Gln-Asn-Ile-Gln-Gli-Arg-Arg-OH

O peptídeo em epígrafe é preparado de duas formas pelo processo de síntese descrito no Exemplo 10, primeiro com

Fmoc-Asn-OH e Fmoc-Gln-OH não protegidos e depois com Fmoc-Asn(Trt)-OH e Fmoc-Gln(Trt)-OH. Partindo da resina Fmoc-Arg(Pmc) (Novabiochem), obtiveram-se sucessivamente, por condensação, os seguintes aminoácidos: Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Gli, Fmoc-Gln ou Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Asn ou Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Gln ou Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Pro, Fmoc-Tir(But), Fmoc-Asn ou Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Gln ou Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Ser(But), Fmoc-Val, Fmoc-Gln ou Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Asn ou Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Ser(But), Fmoc-Arg(Pmc) e Fmoc-Arg(Pmc).

O peptídeo é eliminado da resina após eliminação do grupo Fmoc N-terminal por meio do tratamento com (ácido trifluoroacético)/água/1,2-etanoditiol 90:5:5 durante 8 minutos, sendo os restantes grupos protectores subsequentemente eliminados por meio do tratamento com (ácido trifluoroacético)/água/1,2-etanoditiol/4-mercaptofenol 90:5:3:2 durante 90 minutos. O produto bruto resultante da síntese a (com protecção com tritilo) apresenta no EM-BAR um sinal $(M+H)^+$ para 2414,1 (massa molecular calculada: 2413,7). O perfil CLAP (coluna: Nucleosil 7C18, 125 mm × 4,6 mm; fase móvel: A = ácido trifluoroacético a 0,1% em água, B = ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrilo; gradiente: 0 a 90% de B em 30 minutos; caudal: 1,5 ml/minuto; detecção: 215 nm) dos produtos brutos obtidos em ambos os processos de síntese (a: com protecção com tritilo de Asn e Gln; b: sem protecção com tritilo de Asn e Gln) é apresentado na Figura 1. As abcissas indicam o tempo de retenção em minutos.

Exemplo 12: Fmoc-Lis-Gln-His-Asn-Pro-Lis-Tir-Gln-Trp-Asn-OH

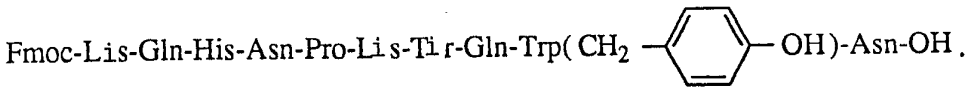
Adicionam-se em quatro porções, no decurso de 5 horas, 3,35 ml (23,4 mmol) de cloreto de 2,6-dicloro-benzoílo (Fluka) a

uma suspensão de 10 g do chamado (álcool 4-benziloxibenzílico)--poliestireno (0,78 mmol OH/g; 1% de ligações cruzadas com divinilbenzeno; os grupos fenilo do poliestireno estão substituídos na posição 4 com 4-hidroximetilfeniloximetilo; Novabiochem), 9,3 g (15,6 mmol) de Fmoc-Asn(Trt)-OH e 3,1 ml (38,5 mmol) de piridina em 60 ml de dimetilacetamida, e a mistura resultante é agitada durante 24 horas. A resina é retirada por filtração e exaustivamente lavada com metanol e 1,2-dicloroetano. A carga sobre a resina é 0,48 mmol/g (determinação de Fmoc por meio de fotometria). Os grupos OH remanescentes são acetilados com (anidrido acético)/piridina/dimetilacetamida 1:1:8 durante 2 horas antes de se iniciar a síntese dos peptídeos. De forma análoga, prepara-se uma resina-Fmoc-Asn(Trt) (substituição de Fmoc-Asn(Trt)-OH por Fmoc-Asn(Tmob)-OH). Esta última tem uma carga de 0,44 mmol/g. Acoplam-se 0,5 g de resina-Fmoc-Asn(Trt) (0,24 mmol de Asn) e 0,5 g de resina-Fmoc-Asn(Tmob) (0,22 mmol de Asn) sucessivamente com os seguintes aminoácidos por meio do processo de síntese descrito no Exemplo 10: Fmoc-Trt, Fmoc--Gln(Trt) ou Fmoc-Gln(Tmob), Fmoc-Tir(But), Fmoc-Lis(Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Asn(Trt) ou Fmoc-Asn(Tmob), Fmoc-His(Trt), Fmoc--Gln(Tmob) e Fmoc-Lis(Boc).

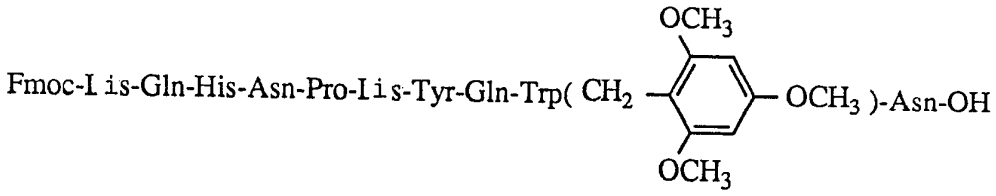
As resinas-peptídeo resultantes são agitadas com (ácido trifluoroacético)/(sulfureto de dimetilo)1,2-etanoditiol 77:20:3 durante 15 minutos a fim de eliminar o peptídeo da resina. Os grupos protectores remanescentes são então eliminados por meio do tratamento com (ácido trifluoroacético)/água/1,2-etanoditiol 90:5:5, à temperatura ambiente, durante 40 minutos.

Os produtos brutos resultantes da síntese com protecção com tritilo do Asn e do Gln (= produto bruto A), por um lado, e com protecção com Tmob do Asn e do Gln (= produto bruto B), por outro, são submetidos a CLAP (coluna: Nucleosil 5C18, 250

mm x 4,6 mm; fase móvel: A = ácido trifluoroacético a 0,1% em água, B = ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrilo; gradiente: 0 a 90% de B em 30 minutos; caudal: 1 ml/minuto; detecção: 215 nm). O composto em epígrafe desejado tem um tempo de retenção de 29,8 minutos. O perfil CLAP do produto bruto obtido na síntese com protecção com tritilo (produto bruto A) revela, além do composto em epígrafe (95%, $(M+H)^+$ no EM-BAR = 1565,4; massa molecular calculada: 1564,7), um sinal (5%) para o tempo de retenção 30,9 minutos para



O perfil CLAP do produto B (com protecção com Tmob) apresenta, além do sinal do composto em epígrafe (apenas cerca de 8%) e do sinal atrás mencionado (cerca de 3%) para um tempo de retenção de 30,9 minutos, um sinal (89%) para um tempo de retenção de 33,7 minutos correspondente a



[$(M+H)^+$ no EM-BAR = 1745,6; massa molecular calculada: 1744,91] e outros sinais muito pequenos.

Exemplo 13: Fmoc-Asn(Trt)-OTcp

Arrefeceu-se até 0° uma solução de 1,5 g (2,51 mmol) de Fmoc-Asn(Trt)-OH e 0,54 g (2,75 mmol) de 2,4,5-tricloro-fenol em 10 ml de tetrahidrofurano. Adiciona-se 0,57 g (2,75 mmol) de diciclohexil-carbodi-imida sob a forma sólida e a mistura é agitada a 0° durante 30 minutos, à temperatura ambiente durante 2 horas e novamente a 0° durante 30 minutos, e a diciclohexilureia que se formou é retirada por filtração. O Fmoc-Asn(Trt)-OTcp separa-se do filtrado ao cristalizar, sendo a cristalização provocada pela adição de 60 ml de hexano. P.f.=133-135°, $[\alpha]_D^{20}$=+51,1° (THF).

Exemplo 14: Fmoc-Gln(Trt)-OTcp

Dissolveram-se 10 g de Fmoc-Gln(Trt)-OH·0,5 éter di-isopropílico e 3,26 g (16,6 mmol) de 2,4,5-tricloro-fenol em 100 ml de tetrahidrofurano e arrefeceu-se a solução até a sua temperatura atingir 0°. Adicionaram-se 3,41 g (16,6 mmol) de diciclohexilcarbodi-imida sob a forma sólida, agitou-se a mistura durante 1 hora a 0°, durante 2 horas à temperatura ambiente e durante 30 minutos novamente a 0°. A diciclohexilureia que se separou ao cristalizar é retirada por filtração e o Fmoc-Gln(Trt)-OTcp que se precipitou sob a forma de um gel após adição de 750 ml de éter de petróleo é retirado por filtração, secado e cristalizado a partir de (cloreto de metileno)/hexano. P.f.=166°, $[\alpha]_D^{20}$=-16,1° (THF).

Exemplo 15: Fmoc-Asn(Trt)-OPfp

Dissolve-se 1,5 g (2,51 mmol) de Fmoc-Asnb(Trt)-OH em 15 ml de tetrahidrofurano. Adiciona-se 0,51 g (2,76 mmol) de

pentafluoro-fenol, arrefece-se a solução até a sua temperatura atingir 0° e, em seguida, adiciona-se 0,57 g (2,76 mmol) de diciclohexilcarbodi-imida sob a forma sólida. A mistura é agitada a 0° durante 30 minutos, à temperatura ambiente durante 2 horas e novamente a 0° durante 30 minutos. A diciclohexilureia que se separou ao cristalizar é retirada por filtração e o filtrado é evaporado até à secura e triturado com 40 ml de éter di-isopropílico. O resíduo pulverulento é retirado por filtração, secado e recristalizado a partir de (cloreto de metileno)/(éter de petróleo). Obtém-se o Fmoc-Asn(Trt)-OPfp. P.f.=154-156°, $[\alpha]_D^{20}$=-7,8° (THF).

Exemplo 16: Fmoc-Gln(Trt)-OPfp

Dissolve-se 1,5 g (2,27 mmol) de Fmoc-Gln(Trt)-OH·0,5 éter di-isopropílico e 0,46 g (2,5 mmol) de pentafluoro-fenol em 35 ml de acetato de etilo, arrefece-se a solução resultante até a sua temperatura atingir 0° e, sob agitação, adiciona-se 0,52 g (2,5 mmol) de diciclohexilcarbodi-imida. A mistura é agitada a 0° durante 1 hora e à temperatura ambiente durante 3 horas, e o material insolúvel é retirado por filtração e lavado com tetrahidrofurano. O filtrado é evaporado até à secura e o resíduo é dissolvido em 30 ml de tetrahidrofurano. A lenta adição de éter de petróleo, sob agitação, provoca a cristalização do Fmoc-Gln(Trt)-OPfp. P.f.=185-187°, $[\alpha]_D^{20}$=-16,4° (THF).

Exemplo 17: Fmoc-Asn(Trt)-ODhbt

Dissolve-se 1,5 g (2,51 mmol) de Fmoc-Asn(Trt)-OH em 10 ml de tetrahidrofurano e mistura-se a solução resultante com uma solução de 0,45 g (2,76 mmol) de 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina em 5 ml de dimetilformamida. A mistura é arrefecida até a sua temperatura atingir 0°, é-lhe adicionado

0,57 g (2,76 mmol) de diciclohexilcarbodi-imida sob a forma sólida e a mistura é agitada a 0° durante 1 hora, à temperatura ambiente durante 3 horas e novamente a 0° durante 1 hora. A diciclohexilureia que se separou é retirada por filtração, o filtrado é evaporado até à secura e o resíduo é triturado com 30 ml de éter di-isopropílico, retirado por filtração e secado. O produto bruto é purificado por meio de nova precipitação a partir de (cloreto de metileno)/hexano. Obtém-se o Fmoc-Asn(Trt)-ODhbt sob a forma de um pó amorfo. P.f.=cerca de 140°, $[\alpha]_D^{20}$=-40,8° (THF).

Exemplo 18: Fmoc-Gln(Trt)-ODhbt

Dissolve-se 1 g (1,51 mmol) de Fmoc-Gln(Trt)-OH·0,5 éter di-isopropílico em 10 ml de acetato de etilo. Adiciona-se 0,27 g (1,66 mmol) de 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzo-triazina sob a forma de um pó fino e, uma vez arrefecida a suspensão até à temperatura de 0°, adiciona-se também 0,34 g (1,66 mmol) de diciclohexilcarbodi-imida sob a forma sólida. Após agitação a 0° durante uma hora, adicionam-se mais 10 ml de acetato de etilo, agita-se a mistura novamente à temperatura ambiente durante 3 horas, retira-se a diciclohexilureia por filtração e lava-se com acetato de etilo. O filtrado é concen-trado até o seu volume se reduzir a 10 ml e o Fmoc-Gln(Trt)-ODhbt separa-se dele ao cristalizar, cristalização essa que é provocada pela adição de 50 ml de éter de petróleo. P.f.=130-133°, $[\alpha]_D^{20}$=-53,7° (THF).

Exemplo 19: H-Asn(Trt)-OH·0,5H_2O

Suspendem-se 20 g (0,1515 mol) de H-Asn-OH e 78,8 g (0,303 mol) de Trt-OH em 455 ml de ácido acético glacial. Adicionam-se 9,28 ml (0,174 mol) de H_2SO_4 conc., seguidos de 28,6

ml (0,303 mol) de anidrido acético, e a mistura é agitada a 60° durante 75 minutos. A dissolução de todo o material é completa após 40 a 50 minutos. O produto de reacção é precipitado mediante a lenta introdução de 910 ml de H_2O gelada. O valor do pH é então ajustado para 6 com cerca de 850 ml de NaOH 1N. A agitação durante cerca de 1 hora é seguida pela filtração, a repetida lavagem com H_2O e depois com tolueno até o filtrado já não conter Trt-OH. O produto em epígrafe resultante decompõe-se lentamente a temperaturas superiores a 220°.

Exemplo 20: Boc-Asn(Trt)-OH

Dissolvem-se 3,83 g (10 mmol) de H-Asn(Trt)-OH·0,5H_2O e 1,37 ml (10 mmol) de trietilamina em 38 ml de tetrahidrofurano a 90%. Adicionam-se 2,2 ml (10 mmol) de dicarbonato de t-butilo e, em seguida, mais 1,37 ml de trietilamina. Deixa-se a reacção processar-se à temperatura ambiente durante 2 1/2 horas e extrai-se a mistura com 250 ml de acetato de etilo e 125 ml de solução aquosa 1M de $KHSO_4$. A fase orgânica é lavada até à neutralidade, secada sobre Na_2SO_4 e evaporada até à secura. O resíduo é cristalizado a partir de metanol/(acetato de etilo)/hexano. P.f. do produto em epígrafe resultante = 201-203°, $[\alpha]_D^{20}$=-17,7±1° (THF).

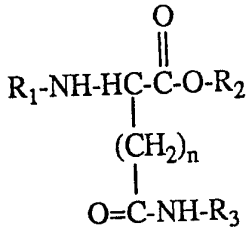
Exemplo 21: Boc-Gln(Trt)-OH

Suspendem-se 3,98 g (10 mmol) de H-Gln(Trt)-OH·0,5H_2O e 1,38 ml (10 mmol) de trietilamina em 60 ml de tetrahidrofurano a 90%, em seguida adicionam-se à suspensão resultante 2,28 ml (10,2 mmol) de $(Boc)_2O$ e mais 1,38 ml de trietilamina e a mistura é agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. Obtém-se uma solução límpida passados 30 minutos. O procedimento subsequente é análogo ao do Exemplo 20 se exceptuarmos o facto de o resíduo

ser cristalizado a partir de metanol/CH_2Cl_2/(éter de petróleo). P.f. do produto em epígrafe resultante: cerca de 112°, $[\alpha]_D^{20}$=-2±1° (THF).

REIVINDICAÇÕES:

1ª - Processo para a preparação de um composto de fórmula (I),



(I)

em que

n representa 1 ou 2

R_1 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino,

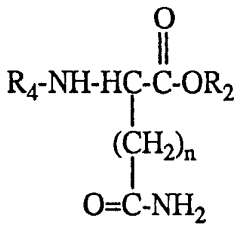
R_2 representa hidrogénio ou um grupo protector de carboxi,

R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo,

um sal de um destes compostos de fórmula (I) contendo um grupo formador de sal ou um derivado de ácido carboxílico reactivo de um destes compostos em que R_2 representa hidrogénio,

caracterizado por:

a) se fazer reagir um composto de fórmula (II),



(II)

em que

R_4 representa hidrogénio ou um grupo protector de amino que é estável nas condições da reacção, e

n e R_2 têm os significados atrás indicados,

com um composto de fórmula (III),

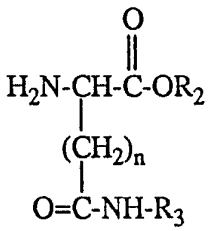
$$R_3\text{-OH} \qquad \text{(III)}$$

em que

R_3 tem os significados atrás indicados,

e por os grupos protectores que não fazem parte do produto final de fórmula (I) desejado serem eliminados do produto resultante, ou

b) para a preparação de um composto de fórmula (I) em que R_1 representa um grupo protector de amino se introduzir um grupo protector de amino num composto de fórmula (IV),

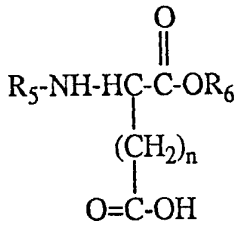


(IV)

em que

n, R_2 e R_3 têm os significados atrás indicados, ou

c) se fazer reagir um composto de fórmula (V),



(V)

em que

n tem o significado atrás mencionado,

R_5 representa um grupo protector de amino que é estável nas condições da reacção, e

R_6 representa um grupo protector de carboxi que é estável nas condições da reacção,

com um composto de fórmula (VI),

$$R_3 - NH_2 \qquad (VI)$$

em que R_3 tem o significado atrás indicado e em que os grupos protectores que não formam parte do produto final de fórmula (I) desejado são eliminados do produto resultante e, caso se deseje, após se ter efectuado um dos processos a), b) ou c) se converter um composto resultante de fórmula (I) com um grupo formador de sal, num sal, ou se converter um sal resultante no composto livre, ou se converter um composto resultante de fórmula (I) em que R_2 representa hidrogénio num derivado de ácido carboxílico reactivo.

2a - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por se fazer reagir entre +20°C e +70° C um composto de fórmula (II)

em que

R_4 representa benziloxicarbonilo ou 9-fluorenil-metoxicarbonilo,

num solvente orgânico adequado, na presença de quantidades catalíticas de um ácido de Lewis forte e isento de água e na presença de um agente de desidratação.

3ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por R_1 ser um grupo protector de amino, R_2 ser hidrogénio e R_3 trimetilfenilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo ou um seu sal metálico ou de amónio.

4ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por R_1 ser benziloxicarbonilo, 9-fluorenil-metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo ou t-butiloxicarbonilo, R_2 ser hidrogénio e R_3 ser trifenilmetilo ou um seu sal metálico ou de amónio.

5ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por R_1 ser 9-fluorenil-metoxicarbonilo ou um sal metálico ou de amónio desse composto, em que R_2 representa hidrogénio.

6ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar benziloxicarbonil-Asn(trifenilmetil)-OH ou um seu sal metálico ou de amónio.

7ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorofenil-metoxicarbonil-Asn-(trifenilmetil)-OH ou um seu sal metálico ou de amónio.

8ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar H-Asn(trifenilmetil)-OH ou um seu sal.

9ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar t-butiloxicarbonil-Asn(trifenilmetil)-OH ou um seu sal.

10ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar benziloxicarbonil-Gln(trifenilmetil)-OH ou um seu sal metálico ou de amónio.

11ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorofenil-metoxicarbonil-Gln-(trifenilmetil)-OH ou um seu sal metálico ou de amónio.

12ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar H-Gln(trifenilmetil)-OH ou um seu sal.

13ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar t-butiloxicarbonil-Gln(trifenilmetil)-OH ou um seu sal.

14ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar um derivado de ácido carboxílico reactivo de um composto de fórmula (I).

15ª - Processo de acordo com as Reivindicações 1 ou 2, caracterizado por se preparar um derivado de ácido carboxílico reactivo de um composto de fórmula (I) sob a forma de um éster 2,4,5-tricloro-fenílico, de um éster pentafluoro-fenílico, de um cloreto de ácido, de um anidrido simétrico, de um éster com 1-hidroxibenzotriazol ou de um éster com 3,4-di-hidro-3-hidroxi--4-oxo-1,2,3-benzotriazina ou de um éster com N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida.

16ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Asn(trifenilmetil)-O-2,4,5-triclorofenilo.

17ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Gln(trifenilmetil)-O-2,4,5-triclorofenilo.

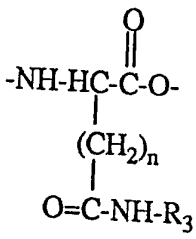
18ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Asn(trifenilmetil)-O-pentafluoro-fenilo.

19ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Gln(trifenilmetil)-O-pentafluoro-fenilo.

20ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Asn(trifenilmetil)-O-3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazinilo.

21ª - Processo de acordo com as Reivindicaçães 1 ou 2, caracterizado por se preparar 9-fluorenil-metoxicarbonil-Gln(trifenilmetil)-O-3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazinilo.

22ª - Processo para a preparação de uma subst@ncia contendo pelo menos um radical bivalente de fórmula (VII),



(VII)

em que

n representa 1 ou 2,

R_3 representa trifenilmetilo, 4-monometoxi-tritilo ou 4,4'-dimetoxi-tritilo,

através da síntese dos peptídeos em fase sólida.

Lisboa, 16 de Abril de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

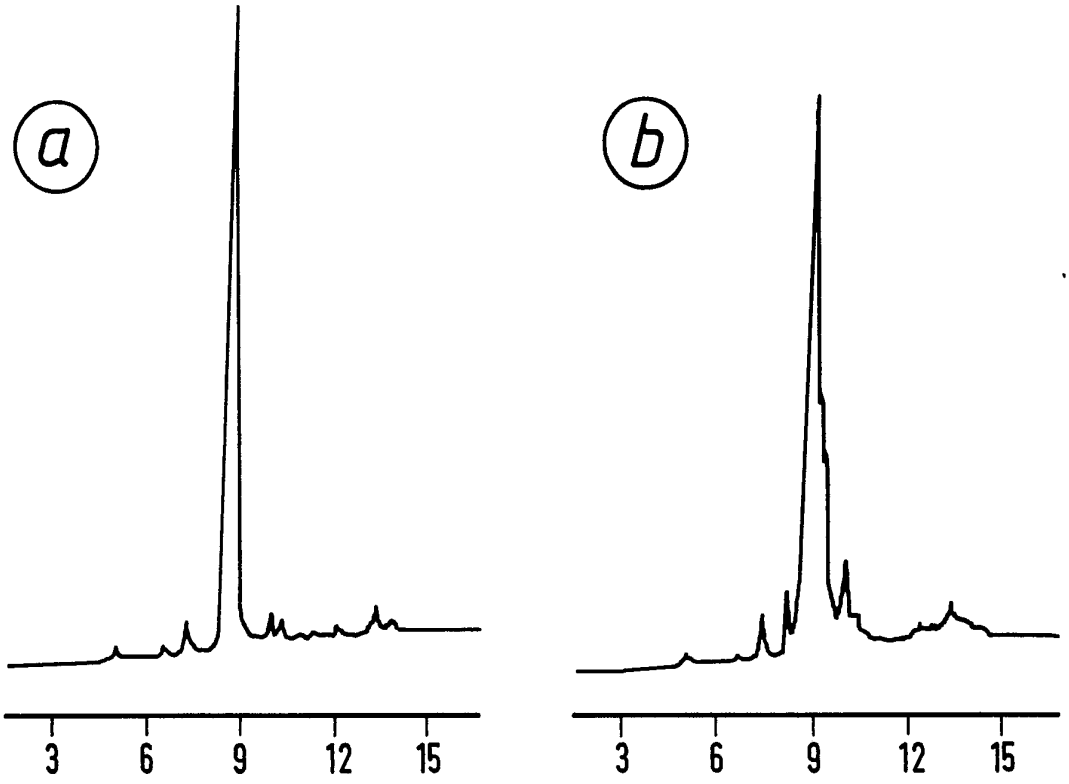


Fig. 1