



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90504 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K007/06 A

A61K037/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.05.09	(73) <i>Titular(es):</i> MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC. 2110 EAST GALBRAITH ROAD CINCINNATI, OHIO 45215 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.05.10 US 192409	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.30	(72) <i>Inventor(es):</i> JOHN LEONARD KRSTENANSKY US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 02/94 1994.02.04	(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 ÁLCOOIS PEPTIDICOS COM ACTIVIDADE ANTICOAGULANTE

(57) *Resumo:*

[Fig.]

P. N. n.º 90.504

1  
/

MERRELL DOW PHARMACEUTICALS, INC.

"Processo para a preparação de álcoois  
peptídicos com actividade anticoagulante"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a novos álcoois peptídicos utilizáveis como agentes anticoagulantes.

Antecedentes da invenção

Os anticoagulantes são agentes terapêuticos úteis no tratamento farmacológico de, por exemplo, trombose aguda das veias profundas, embolia pulmonar, embolia aguda arterial das extremidades, enfarte miocárdio e coagulação intravascular disseminada. Acredita-se que a administração profiláctica de agentes anticoagulantes impessa a ocorrência da embolia nos doentes com doença cardíaca arteriosclerótica ou reumática e impessa certas complicações tromboembólicas da cirurgia. A administração de agentes anticoagulantes também se têm indicado no tratamento de doença das artérias coronárias e cerebrovascular. A trombose arterial,

particularmente nas artérias que irrigam o músculo cardíaco e o cérebro é uma causa de morte.

A hirudina é um polipeptido de 65 resíduos isolado das glândulas salivares das sanguessugas. É um agente anticoagulante, que constitui um inibidor específico da trombina. Ainda que muito potente o uso clínico da hirudina isolada a partir de extractos de sanguessuga parece pouco provável devida à sua quantidade limitada, custo e reacções alérgicas que correntemente se seguem à administração de qualquer proteína estranha desta dimensão.

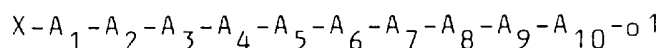
Os requerentes descobriram uma região específica de hirudina que é responsável pelo menos em parte, pela sua actividade anticoagulante. Esta região tem sido sintetizada quimicamente e certos dos seus análogos apresentam-se ligados ao sítio de reconhecimento da trombina, mas não ao sítio de cisão enzimática que está separado especialmente. A ligação dos peptidos sintéticos competitivamente impede a ligação do fibrinogéneo ao sítio de reconhecimento da trombina, uma pré-exigência da produção da fibrina e da formação do coágulo. Os requerentes prepararam então certos derivados reduzidos deste peptido. A função ácido carboxílico destes novos derivados foi reduzida para a sua correspondente função álcool. Os álcoois peptídicos da presente invenção possuem uma actividade anticoagulante significativa e a sua capacidade pouco comum para se ligarem apenas ao sítio de reconhecimento sem se ligarem ao sítio de clivagem da trombina podem permitir um interessante significado terapêutico e científico como adjuvante da terapêutica anticoagulante. Além disso a presença da

- 3 -  
4.

função álcool pode proporcionar uma potência reforçada e uma duração prolongada de acção.

### Resumo da invenção

São agentes anticoagulantes úteis os derivados peptídicos da fórmula geral I



na qual

X representa um átomo de hidrogénio ou um ou dois grupos alquilo com 1 a 6 átomos de carbono ou um ou dois grupos acilo com 2 a 10 átomos de carbono, carbobenziloxi ou t-butiloxi carbonil;

A<sub>1</sub> representa uma ligação ou um fragmento peptídico com 1 a 11 restos de um amino-ácido qualquer;

A<sub>2</sub> representa um grupo Phe, SubPhe,  $\beta$ -(2- e 3-tienil)-alanina,  $\beta$ -(2- e 3-furanil)-alanina,  $\beta$ -(2-,3- e 4-piridil)-alanina,  $\beta$ -(benzotienil-2- e 3-il)-alanina,  $\beta$ -(1- e 2-naftil)-alanina, Tyr ou Trp;

A<sub>3</sub> representa Glu ou Asp;

A<sub>4</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>5</sub> representa Ile, Val, Leu, Nle ou Phe;

A<sub>6</sub> representa Pro, Hyp, 3,4-desidro Pro, um grupo tiazoli-

- 4 -  
4.

dina-4-carboxilato, Sar, Nm e Pgl ou D-Ala;

A<sub>7</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>8</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>9</sub> representa um aminoácido lipofílico escolhido entre Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha e Pro ou representa um dipeptido comportando pelo menos um destes aminoácidos lipofílicos;

A<sub>10</sub>-ol representa um fragmento peptídico reduzido comportando zero a cinco restos de um aminoácido qualquer no qual o átomo de carbono terminal do aminoácido é reduzido para o derivado álcool correspondente.

#### Descrição detalhada da invenção

As abreviações correntes seguintes dos aminoácidos são utilizadas durante esta memória descritiva:

Ac - acetilo

Ala (ou A) - alanina

DAla (ou a) - D-alanina

Arg (ou R) - arginina

Asn (ou N) - asparagina

Asp (ou D) - ácido aspártico

pClPhe - para-cloro-fenilalanina

Cha - ciclohexilalanina

Cys (ou C) - cisteína

3,4-~~de~~hidroPro - 3,4-dehidroprolina



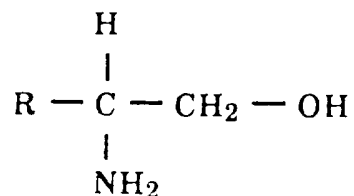
Gly (ou G) - glicina  
Glu (ou E) - ácido glutamínico  
D-Glu (ou e) - ácido D-glutâmico  
Gln (ou Q) - glutamina  
Glt - glutarilo  
His (ou H) - histidina  
Hyp - hidroxiprolina  
Ile (ou I) - isoleucina  
Leu (ou L) - leucina  
Lys (ou K) - lisina  
Mal - maleilo  
Met (ou M) - metionina  
NMePgl - N-metil-fenilglicina  
Npa -  $\beta$ -(naftil)alanina  
pNO<sub>2</sub>Phe - para-nitro-fenilalanina  
Nle - norleucina  
Orn - ornitina  
pSubPhe - para-fenilalanina substituída  
Phe (ou F) - fenilalanina  
Pgl - fenilglicina  
Pro (ou P) - prolina  
Sar - sarcocina (N-metilglicina)  
Ser (ou S) - serina  
SubPhe - orto, meta, ou para, mono<sup>-</sup> ou di-substituído  
fenilalanina substituída.  
Suc - succinilo  
Thr (ou T) - treonina

Trp (ou W) - triptofano

Tyr (ou Y) - tirosina

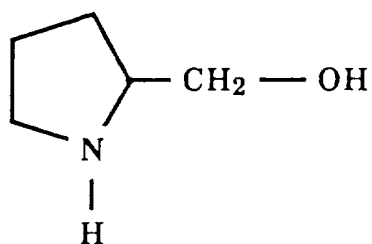
Val (ou V) - valina

Pela expressão "fragmento peptídico reduzido contendo um a 5 resíduos de aminoácidos em que o átomo de carbono do aminoácido terminal é reduzido para o derivado álcool correspondente" entende-se que o átomo de carbono do grupo ácido carboxílico do aminoácido terminal é substituído por um grupo hidroximetílico- $-(CH_2)OH$ . Enquanto o grupo representado por  $A_{10}$  dos polipeptidos da presente invenção pode conter até cinco aminoácidos, entende-se que apenas o átomo de carbono do aminoácido terminal pode ser reduzido ao seu derivado álcool correspondente. De facto não é evidentemente possível que outro qualquer átomo de carbono de aminoácido além do átomo de carbono do aminoácido terminal se possa reduzir devido à ligação peptídica o tornar impossível. Evidentemente nestas circunstâncias em que  $A_{10}$  representa um único aminoácido este aminoácido é o ácido reduzido para o derivado álcool. A fórmula de estrutura para estes aminoácidos reduzidos pode ser representada como:



em que R representa um grupo característico de cada aminoácido. Por exemplo no caso da glicina R representa um átomo de hidrogénio,

no caso da alanina R representa um grupo metilo, no caso da valina um grupo isopropilo, no caso da fenilalanina um grupo benzilo e no caso da cisteína um grupo mercaptometilo. A forma reduzida da prolina é um álcool com a fórmula de estrutura seguinte:



Aqui, um aminoácido que é reduzido para o seu derivado álcool será abreviado utilizando-se o código de três letras, (ou outra forma encurtada), ou o código de uma letra seguida por "-ol", por exemplo, "Ala-ol" ou "A-ol" significa uma alanina em que o radical ácido carboxílico foi reduzido para o correspondente álcool e "Leu-ol" ou "L-ol" representa uma leucina em que o radical ácido carboxílico se reduziu para o álcool correspondente.

Um grupo alquilo e uma fração alquílica de um grupo alcoxi é considerado como incluindo grupos alquilo de cadeia linear ramificada ou cíclica, por exemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, ciclopentilo, hexilo, iso-hexilo, ciclo-hexilo e ciclo-pentilmetilo. Considera-se que um grupo acilo de 2 a 10 átomos de carbono inclui os grupos acilo saturados ou insaturados de cadeia linear ramificada ou cíclica com 1 a 2 radicais carbonilo por grupo, por exemplo, acetilo, succinilo benzoílo, maleílo e



glutarilo. Um grupo halogênio considera-se ser um grupo fluoro, cloro, bromo ou iodo.

A designação "aminoácido qualquer" é aqui utilizada não para significar um aminoácido qualquer com um substituinte amina, mas para ser utilizado como correntemente para os derivados polipeptídicos e inclui os aminoácidos de ocorrência natural assim como outros  $\alpha$ -aminoácidos "não proteicos" correntemente utilizados pelos técnicos na química de peptídeos quando preparam análogos sintéticos dos peptídeos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são a glicina, alanina, valina leucina, isoleucina, serina, metionina, treonina, fenilalanina, tirosina, triptofano, cisteína, prolina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, arginina, ornitina e lisina. Exemplos de  $\alpha$ -aminoácidos "não proteicos" são: norleucina, norvalina, aloisoleucina, homo-arginina, tiaprolina, desidropolina, hidroxiprolina (Hyy), homoserina, ciclo-hexilglicina (Chg), ácido  $\alpha$ -amino-n-butírico (Aba), ciclo-hexilalanina (Cha), ácido aminofenilbutírico (Pba), fenilalaninas substituídas nas posições orto, meta ou para no radical fenilo com um ou dois dos seguintes grupos, alquilo ( $C_1-C_4$ ), alcoxi ( $C_1-C_4$ ), átomos de halogênio ou grupos nitro ou grupos substituídos com um grupo metilenodioxo,  $\beta$ -2- e 3-tienilalanina,  $\beta$ -2- e 3-furanilalanina,  $\beta$ -2-, 3-, e 4-piridilalanina,  $\beta$ -(benzotienil-2- e 3-il)-alanina,  $\beta$ -(1- e 2-naftil)-alanina, derivados orto-alquilados de serina, treonina ou tirosina, cisteína S-alquilada, éster O-sulfato de tirosina, 3,5-diidotirosina e D-isômeros dos aminoácidos de ocorrência natural.

A designação "aminoácido lipofílico" inclui Tyr, Phe, Leu, Met, Nle, Ile, Val, His e Pro.

Os aminoácidos naturais com excepção de glicina contém um átomo de carbono quirático. A menos que especificado de outro modo, os aminoácidos opticamente activos, aqui referidos são os de configuração L-. Por exemplo, qualquer dos aminoácidos representados por  $A_1$  ou  $A_{10}$  podem apresentar a configuração D- ou L-. Como é habitual a estrutura de peptidos aqui indicada é a que apresenta uma extremidade amino terminal no lado esquerdo de cadeia e uma extremidade carboxi terminal no lado direito da cadeia.

Os polipeptidos de fórmula geral I podem formar sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico com quaisquer ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos. Ácidos inorgânicos representativos que formam sais apropriados incluem o ácido clorídrico, o ácido bromídrico, o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico e sais de metal tais como o mono-hidrogeno-ortofosfato de sódio e o hidrogeno-sulfato de potássio. Ácidos orgânicos representativos que formam sais apropriados incluem os ácidos mono, di e tricarboxílicos. São representativos destes ácidos por exemplo o ácido acético, o ácido glicólico, o ácido láctico, o ácido pirúvico, o ácido malónico, o ácido succínico, o ácido glutárico, o ácido fumárico, o ácido málico, o ácido tartárico, o ácido cítrico, o ácido ascórbico, o ácido maleico, o ácido hidroximaleico, o ácido benzoico, o ácido hidroxibenzoico, o ácido fenilacético, o ácido cinâmico, o ácido salicílico, os ácidos 2-fenoxibenzoico e ácidos sulfónicos tais como o ácido metano-sulfónico e o ácido

2-hidroxietano-sulfônico. Sais de radicais de aminoácidos de carboxi terminal incluem os sais de ácidos carboxílicos não tóxicos formados com bases orgânicas ou bases inorgânicas apropriadas. Representativamente, estes sais incluem os sais de metais alcalinos como por exemplo, os sais de sódio e de potássio; os sais de metais alcalino-terrosos tais como os de cálcio e magnésio; O grupo dos metais leves, IIIA incluindo o alumínio; e aminas orgânicas primárias, secundárias e terciárias, como por exemplo, trietilaminas, incluindo trietilaminas, procaína, dibenzilamina, 1-etenamina, N,N'-dibenziletilenodiamina, di-hidroabietilamina, N-(alquil inferior) piperidina e outras aminas quaisquer apropriadas.

Como com outro qualquer grupo genérico de compostos químicos são preferidos certos grupos. Os requerentes preferem os derivados peptídicos de fórmula geral I em que

X representa um átomo de hidrogênio, um grupo acetilo ou succinilo.

Também são preferidos os compostos de fórmula geral I em que

A<sub>1</sub> representa Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp,  
-Ser-Thr-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-  
Asp-,  
-His-Asn-Asp-Gly-Asp-,  
-Asn-Asp-Gly-Asp-,  
-Asp,Gly,Asp-,

-Gly-Asp-,

-Asp-, ou uma ligação;

A<sub>2</sub> representa Phe,  $\beta$ -2- ou 3-tienilalanina, Tyr, Trp, Npa ou pClPhe;

A<sub>3</sub>, representa Glu;

A<sub>4</sub>, representa Glu, Asp, Pro ou Ala;

A<sub>5</sub>, representa Ile, Leu;

A<sub>6</sub>, representa Pro, Sar, D-Ala, Hyp ou NMePgl;

A<sub>7</sub>, representa Glu, Gln, Asp ou Ala;

A<sub>8</sub>, representa Glu, Asp ou Ala;

A<sub>9</sub>, representa Pro, Ala-Tyr, Ala-Cha, Tyr-Cha, Tyr-Leu, Ala-Phe, Tyr-Tyr;

A<sub>10</sub>-ol, representa Glu-ol, Asn-ol, Pro-ol, Gln-ol, Ala-ol, D-Lys-ol, Lys-ol, D-Asp-ol, Orn-ol ou Asp-Glu-ol.

Especialmente preferidos são os derivados peptidos de fórmula geral I

em que

X representa um grupo acetilo e A<sub>1</sub> representa Gly-Asp ou Asp ou

X representa um grupo succinilo e A<sub>1</sub> representa uma ligação, em que

A<sub>2</sub> representa Phe,  $\beta$ -(2-tienilalamina) ou Tyr;

A<sub>3</sub> representa Glu;

A<sub>4</sub> representa Glu ou Pro;

A<sub>5</sub> representa Ile;

A<sub>6</sub> representa Pro;

A<sub>7</sub> representa Glu;

A<sub>8</sub> representa Glu ou Asp;

A<sub>9</sub> representa Tyr-Leu, Ala-Tyr, Tyr-Tyr, Ala-Phe,  
Ala-Cha ou Pro; e

A<sub>10</sub>-ol representa Ala-ol, Gln-ol, Asp-ol, Pro-ol, D-Asp-ol,  
D-Lys-ol, D-Glu-ol ou Asp-Glu-ol.

As proteínas da presente invenção podem-se preparar por uma diversidade de processos facilmente conhecidos para os técnicos. Estes processos incluem a síntese sequencial de fase sólida e de bloco, colunagem de genes e combinação destas técnicas. O processo sequencial de fase sólida pode realizar-se utilizando-se métodos automatizados estabelecidos tais como os que usam um sintetizador peptídico automático. Neste processo os peptidos foram construídos sobre resina iniciando-se com o penúltimo C-terminal de aminoácido protegido. Pode-se utilizar como suporte de resina qualquer resina apropriada utilizada de modo convencional na preparação de fase sólida de polipéptidos, de preferência polistireno reticulado com cerca de 0,5 a 3% de divinilbenzeno, que foi o cloro-metilado ou hidroximetilado para proporcionar sítios de formação éster com o aminoácido introduzido inicialmente na forma  $\alpha$ -amino protegida. Após completar-se a ligação de acoplamento ou o grupo de protecção Boc permanece ou é eliminado e o grupo amino N-terminal acilado. O deslocamento do fragmento protegido da resina é realizado utilizando-se o amino álcool apropriado.

4.

Um exemplo de uma resina hidroximetilada está descrito por Bodanszhy et al., Chem. Ind. (London) 38,1597-98 (1966). Uma resina clorometilada é comercializada pelo Bio Rad Laboratories, Richmond, Califórnia e a preparação desta resina está descrita por Stewart et al, em "Solid Phase Peptide Synthesis" capítulo 1 páginas 1 a 6, (1969, Freeman & Co., San Francisco). O aminoácido protegido pode ligar-se à resina pelo processo de Gisin, Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973). Muitas das resinas de ligação do aminoácido protegidas estão comercializadas. Como exemplo, para se preparar um polipeptido desta invenção em que o terminal carboxilo é um resíduo Thr, pode utilizar-se Thr protegido por *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) ligado a uma resina benzilada, hidroximetilada de fenilacetamidometilo (Pam) que está comercializada.

A seguir ao acoplamento do aminoácido  $\alpha$ -amino protegido ao suporte resina, elimina-se o grupo de protecção utilizando-se qualquer processo adequado tal como o processo que utiliza o ácido trifluoro-acético em cloreto de metileno, ácido trifluoro-acético apenas, ou ácido clorídrico em dioxano. Realiza-se a desprotecção a uma temperatura entre 0°C e a temperatura ambiente. Podem utilizar-se outros reagentes de separação e condições padrão para a eliminação dos grupos de protecção  $\alpha$ -amino específicos. Após a eliminação do grupo de protecção  $\alpha$ -amino os outros aminoácidos amino protegidos são ligados passo a passo na ordem desejada. Alternativamente grupos de aminoácidos múltiplos podem ser ligados pelo método de solução antes da ligação com a resina que serve de suporte à sequência de aminoácidos.



O grupo protector  $\alpha$ -amino utilizado para cada aminoácido introduzido na sequência peptídica pode ser um qualquer grupo de protecção conhecido. Entre as classes de grupo de protecção  $\alpha$ -amino considerados estão:

(1) grupos de protecção acilo tais como: formilo, trifluoroacetilo, ftalilo, toluenosulfonilo (tosilo), benzenosulfonilo, nitrofenilsulfenilo, tritilsulfenilo, D-nitrofenoxiacetilo e  $\alpha$ -clorobutirilo; (2) grupos de protecção tipo uretano aromáticos tais como benziloxicarbonilo e benziloxicarbonilo substituído, tais como p-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenzil-carbonilo, p-bromobenziloxicarbonilo, p-metoxibenziloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metil-etoxicarbonilo,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxi-carbonilo e benzidriloxicarbonilo; (3) grupos de protecção uretano alifáticos tais como terc-butiloxicarbonilo (Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo e aliloxicarbonilo; (4) grupo de protecção tipo uretano cicloalquílicos tais como ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo e ciclohexiloxicarbonilo; (5) grupos de protecção tipo tio uretano tais como feniltiocarbonilo; (6) grupos de protecção alquílicos tais como trifenilmetilo (tritilo) e benzilo; e (7) grupos de trialquiesilano tais como trimetilsilano. O grupo de protecção  $\alpha$ -amino preferido é o grupo terc-butiloxicarbonilo.

A selecção de o reagente de ligação apropriado é própria do técnico. Um reagente de ligação particularmente apropriado em que o aminoácido a adicionar é o aminoácido Gln, Asn ou Arg, são os grupos N-N'-diisopropilcarbodiimida e 1-hidroxibenzotriazol.



O uso destes reagentes impede a formação de nitrilo ou de lactama. Outros agentes de acoplamento são (1) as carbodiimidas (por exemplo, N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida) e N-etil-N'-( $\gamma$ -dimetilaminopropilcarbodiimida); (2) as cianamidas (por exemplo, N, N-dibenzilcianamida); (3) as ceteniminas; (4) os sais de isoxazólio (por exemplo, N-etil-5-fenil-isoxazólio-3'-sulfonato; (5) azoto monocíclico contendo amidas heterocíclicas de carácter aromático que contém um a quatro átomos de azoto no núcleo tais como imidazólidos, pirazólidos e 1,2,4-triazólidos. Amidas heterocíclicas específicas que são utilizáveis incluem a N,N'-carbonildiimidazol e o N, N-carbonil-di-1,2,4-triazol; (6) acetileno alcoilado (por exemplo, etoxiacetileno); (7) reagentes que formam um anidrido misto com o radical carboxil do aminoácido, (por exemplo o cloroformato de etilo e o cloroformato de isobutilo ou o anidrido simétrico do aminoácido a ligar-se (por exemplo, Boc-Ala-O-Ala-Boc) e (8) compostos heterocíclicos contendo azoto que apresenta um grupo hidroxil ou um núcleo azotado (por exemplo, N-hidroxi-ftalimida, N-hidroxisuccinimida e 1-hidroxi-benzotriazol). Outros reagentes de activação e sua utilização na ligação peptídica estão descritos por Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, pp. 1-27 (1970). Os requerentes preferem a utilização do anidrido simétrico como um reagente de acoplamento para todos os aminoácidos excepto para Arg, Asn e Gln.

Cada aminoácido ou a sequência de aminoácidos protegidos é introduzido num reactor de fase sólida num excesso de cerca de quatro vezes e realizando-se a ligação num meio de dimetilformamida:

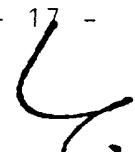




cloreto de metileno (1:1) ou apenas em dimetilformamida ou de preferência apenas em cloreto de metileno. Nos casos em que ocorre ligação incompleta, o processo de ligação é repetido antes da eliminação dos grupos de protecção  $\alpha$ -amino, antes de se ligar o aminoácido seguinte no reactor de fase sólida. O sucesso da reacção de ligação em cada estágio da síntese é controlado pela reacção da ninidrina como descrito por E. Kaiser et al., Analyt. Biochem 34, 595 (1970).

Após a obtenção da sequência de aminoácidos desejada, retira-se da resina o peptido. Isto pode ser feito por meio de hidrólise, como por exemplo, por tratamento do peptido ligado à resina com um resíduo de aminoálcool de C-terminal, ácido acético ou diclorometano (DCM).

Como se sabe a síntese peptídica de fase sólida dos aminoácidos que comportam grupos funcionais requer a protecção durante a preparação da cadeia. A utilização e selecção dos grupos de protecção apropriados é uma capacidade dos técnicos nesta matéria e dependerá do aminoácido a proteger e da presença de outros resíduos de aminoácidos protegidos, no peptido. A selecção de um grupo de protecção da cadeia lateral destes, é crítica porque deverá ser um grupo não removível por clivagem durante a separação do grupo de protecção do radical  $\alpha$ -amino. Por exemplo, grupos de protecção da cadeia lateral apropriados para a lisina, são os grupos benziloxicarbonilo e benziloxicarbonilo substituídos, sendo referidos substituintes escolhidos entre átomos de halogéneo,



(por exemplo, cloro, bromo, fluoro) e grupos nitro, (por exemplo, 2-clorobenziloxicarbonilo, p-nitrobenziloxi-carbonilo, 3,4-diclorobenziloxicarbonilo), tosilo, t-amiloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo e diisopropilmetoxicarbonilo. O grupo hidroxil alcoólico da treonina e da serina pode ser protegido com um grupo acetilo, benzoílo, terc-butilo, tritilo, benzilo, 2,6-diclorobenzil ou benziloxicarbonilo. O grupo de protecção preferido é o grupo benzilo.

Estes grupos podem ser eliminados por processos convencionais. Tipicamente, os grupos de protecção são eliminados após a síntese da cadeia peptídica estar completa, mas os grupos de protecção podem ser eliminados em qualquer outro momento apropriado.

A dose anticoagulante de um derivado álcool peptídico da presente invenção é desde 0,2 mg/kg até 250 mg/kg de peso do corpo por dia, dependendo do estado do doente, da gravidade da condição trombótica a tratar e do derivado peptídico escolhido. A dose apropriada para um doente particular pode ser determinada facilmente. De preferência deverão ser administradas doses diárias entre 1 a 4 de 5 mg a 100 mg de composto activo por dose. A quantidade de um álcool peptídico da presente invenção necessária para inibir ou impedir a coagulação do sangue num meio extracorporal tais como sangue completo em conservação, pode ser determinada facilmente por um técnico.

A terapêutica anticoagulante está indicada para o tratamento e prevenção de uma diversidade de doenças trombóticas, particularmente na doença da artéria coronária e cerebrovascular. Os téc-

nicos com experiência neste campo avaliam rapidamente as circunstâncias que requerem terapêutica anticoagulante. A designação "doente" aqui utilizada, significa mamíferos tais como primatas, incluindo seres humanos, carneiros, cavalos, gado, suínos, cães, ratos e murganhos. A inibição da coagulação sanguínea é útil não sómente na terapêutica anticoagulante dos indivíduos com doenças trombóticas, mas também quando se deseja a inibição da coagulação sanguínea, por exemplo para impedir a coagulação do sangue total armazenado ou para impedir a coagulação de outras amostras biológicas para análise ou armazenagem.

Ainda que alguns dos derivados peptídicos possam sobreviver à passagem através do intestino após a administração oral, os requerentes preferem uma administração por outra via, por exemplo, subcutânea, endovenosa, intramuscular ou intraperitoneal; por preparação de implantação ou por aplicação nas membranas mucosas, tais como no nariz, garganta, ou ramos brônquicos, por exemplo, sob a forma de um aerosol contendo um derivado peptídico da presente invenção em spray ou sob a forma de pó seco.

Para administração parentérica podem-se administrar os compostos em formas injectáveis de uma solução ou suspensão do composto num dissolvente aceitável sob o ponto de vista fisiológico com um veículo farmacêutico que pode ser um líquido estéril tal como a água e óleos ou eventual adição de um agente tenso activo ou doutros adjuvantes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Óleos exemplificativos que podem ser utilizados nas preparações,

são os óleos de parafina, de origem vegetal, animal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja e óleo mineral. Em geral são veículos líquidos para soluções, em particular para soluções injectáveis, a água, a solução de cloreto de sódio, a dextrose aquosa e soluções de açúcares idênticos, o etanol e os glicóis tais como o propilenoglicol ou o polietilenoglicol.

Os compostos podem ser administrados sob a forma de uma injeção depósito ou de uma preparação de implantação que pode ser formulada de tal modo a permitir a libertação controlada do ingrediente activo. O ingrediente activo pode ser comprimido em "pellets" ou em pequenos cilindros implantado por via subcutânea ou intramuscular sob a forma de injeções de depósito ou de implantes. Os implantes podem utilizar materiais inertes tais como os polímeros biodegradáveis ou silicones sintéticos, por exemplo Silastic, borracha de silicone preparada pela Dow-Corning Corporation.

### Exemplos

A presente invenção é ilustrada pelos exemplos seguintes não limitativos.

#### Exemplo 1

##### Preparação de álcoois peptídicos de carbono terminal

Sintetizaram-se peptidos utilizando-se uma resina p-nitrobenzidrilideno-isonitrosa (resina de óxima) preparada pelo método

de DeGrado e Kaiser (J. Org. Chem. 45, 1295-1300 (1980)). A resina de óxima, (0,54g, 0,52 mmole/0,97 mmole/g-substituição), foi colocada num recipiente de um sintetizador de peptidos Applied Biosystems Model 430A. Os aminoácidos Boc-protégidos ligados por sequência simples aos seus anidridos simétricos com um excesso duplo. A protecção da cadeia lateral utilizada foi a seguinte: Asp (Chx), Glu (Bzl), Tyr (2-BrZ). Os programas do sintetizador foram estabelecidos para fornecerem o protocolo seguinte para cada ciclo:

- 1) Adição de 1 mmole de anidrido simétrico pré-formado;
- 2) Adição de um volume de DIEA adicional a 5%;
- 3) Vortex durante 1 hora
- 4) Escoamento
- 5) Lavagem (5x/1min.) com DCM;
- 6) Lavagem (1 min.) com TFA a 20% em DCM;
- 7) Tratamento com TFA a 20% em DCM durante 15 minutos
- 8) Lavagem com DCM (3x/0,5 min.);
- 9) Lavagem (4 min.) com isopropanol;
- 10) Lavagem (3x/0,5 min.);
- 11) Lavagem com isopropanol (4 min.);
- 12) Lavagem com DCM (3x/0,5 min.);
- 13) Lavagem com isopropanol (4 min.);
- 14) Lavagem (3x/0,5 min.).

Após a terminação da síntese, secou-se a resina no vácuo. Em seguida tratou-se a resina com 2 equivalentes (baseado na substituição de resião inicial) de alaninol e 1 equivalente de ácido



acético em DCM à temperatura ambiente durante 20 horas. Filtrou-se a resina. Liofilizou-se o filtrado. O resíduo foi tratado com HF líquido contendo 2% de anisol à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Após a eliminação do ácido fluorídrico gasoso no vácuo, extraiu-se o péptido com acetonitrilo a 30% e liofilizou-se. Purificou-se o resíduo por HPLC preparativa (coluna de 21,4x150 mm Dinamax C18) utilizando-se um sistema de acetonitrilo/TFA a 0,1%. O péptido obtido por este método forneceu um pico do ião molecular desejado por TAB-MS e apresentou uma análise de aminoácidos de acordo com o peptido desejado. Deste modo prepararam-se os peptidos seguintes com as propriedades estabelecidas.

1) SucFEPIPEYL-ol

MW 1092.6 FAB-MS (MH)<sup>+</sup> 1094.0 t<sub>R</sub> 17.53  
E<sub>280</sub> 1573 conteúdo peptídico 79.8%  
Glx(2) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Phe(1)  
2.08 1.01 0.94 0.99 0.98

2) SucFEPIPEEYCHaA-ol

MW 1332.7 FAB-MS (MH)<sup>+</sup> 1333.4 t<sub>R</sub> 20,2 min.  
E<sub>280</sub> 1755 conteúdo peptídico 73%  
Glx(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Phe(1) Cha(1)  
3.04 2.03 0.92 1.00 0.97 0.95

3) SucFEPIPEEYL-ol

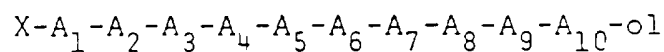
MW 1221.6 FAB-MS (MH)<sup>+</sup> 1222.8 t<sub>R</sub> 16.83  
E<sub>280</sub> 1686 conteúdo peptídico 72.1%  
Glx(3) Pro(2) Ile(1) Phe(1)  
3.09 1.98 0.96 1.00



REIVINDICAÇÕES

-----

1.- Processo para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral



na qual

X representa um átomo de hidrogênio ou um ou dois grupos alquilo com 1 a 6 átomos de carbono ou um ou dois grupos acilo com 2 a 10 átomos de carbono;

A<sub>1</sub> representa uma ligação ou um fragmento peptídico comportando 1 a 11 restos de um aminoácido qualquer;

A<sub>2</sub> representa um grupo Phe, SubPhe,  $\beta$ -(2- e 3-tienil)-alanina,  $\beta$ -(2-3-furanil)-alanina,  $\beta$ -(2-,3- e 4-piridil)-alanina,  $\beta$ -(benzotienil-2- e 3-il)-alanina,  $\beta$ (1- e 2-naftil)-alanina, Tyr ou Trp;

A<sub>3</sub> representa Glu ou Asp;

A<sub>4</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>5</sub> representa Ile, Val, Leu, Nle, ou Phe;

A<sub>6</sub> representa Pro, Hyp, 3,4-desidro-Pro, um grupo tiazolidina-4-carboxilato, Sar, NMePgl ou D-Ala;

A<sub>7</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>8</sub> representa um aminoácido qualquer;

A<sub>9</sub> representa um aminoácido lipofílico escolhido entre Tyr, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha ou Pro ou representa um dipeptido comportando pelo menos um destes aminoácidos lipofílicos;

A<sub>10</sub>-ol representa um fragmento peptídico reduzido comportando zero a 5 restos de um aminoácido qualquer no qual o átomo de carbono terminal do aminoácido é reduzido para o derivado álcool correspondente,

caracterizado pelo facto:

a) de se ligar um aminoácido apropriadamente protegido correspondente ao aminoácido A<sub>9</sub> a um suporte de resina activada;

b) de se ligarem, em seguida, os outros aminoácidos alfa-amino-protegidos, em sequência, do terminal carboxilo ao terminal amino, A<sub>8</sub> até A<sub>1</sub>, para a extremidade amino-terminal da cadeia peptídica em crescimento que entretanto, for exposta por eliminação dos seus grupos amino-protectores; e

c) de se tratar, finalmente, o péptido ligado à resina com cerca de 2 equivalentes de amino-álcool de terminal carboxilo





correspondente ao símbolo  $A_{10}$ -ol e com cerca de 1 equivalente de ácido acético em diclorometano, para separar o polipeptido da resina e de se ligar, concomitantemente, o álcool peptídico de terminal carboxilo ao péptido, obtendo-se assim o álcool peptídico desejado.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_2$  representa Phe,  $\beta$ -(2- ou 3-tienil)-alanina ou Tyr, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_3$  representa Glu, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_4$  representa Glu, Ala ou Pro, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_5$  representa Ile, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais

4.

correspondentemente substituídos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_6$  representa Pro, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $R_7$  representa Glu ou Ala, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_8$  representa Glu ou Asp, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_9$  representa Tyr-Leu, Ala-Tyr ou Ala-Cha, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I, na qual  $A_{10}$ -ol representa Gln-ol, Asp-ol, Pro-ol, Asn-ol, Asp-Glu-ol, Glu-ol,



Ala-ol, D-Lys-ol, Lys-ol, D-Asp-ol, D-Glu-ol ou Orn-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual X representa um átomo de hidrogénio ou um grupo acetilo ou succinilo, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual A<sub>1</sub> representa uma ligação ou

Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp,

Asn-Asp-Gly-Asp,

Asp-Gly-Asp,

Gly-Asp ou

Asp,

caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual A<sub>1</sub> representa -Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente

substituídos.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral I na qual  $A_1$  representa -Thr-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Phe-Gly-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula H-Gly-Asp-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Asp-Ala-Tyr-Asp-Glu-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-

-Glu-Glu-Tyr-Leu-Pro-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Pro-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe-D-Lys-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Tyr-Lys-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-

-Glu-Glu-Ala-Cha-Lys-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-Lys-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos,

25.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe-Glu-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe-Gln-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Glu-Glu-Ala-Cha-Asp-ol, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

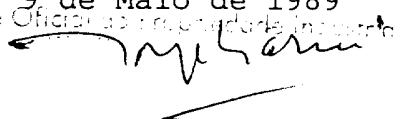
28.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas para administração a um doente com necessidade de reduzir a coagu-

4.

lação sanguínea, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade anticoagulante eficaz, compreendida entre 0,2mg/kg e 250mg/kg de peso do corpo de um álcool peptídico preparado pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 27, como ingrediente activo, com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico,

Lisboa, 9 de Maio de 1989

Dr. António José de Sousa

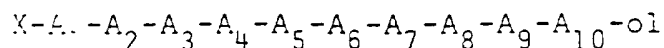




R E S U M O  
=====

"Processo para a preparação de álcoois peptídicos com actividade anticoagulante"

A invenção diz respeito da um processo para a preparação de álcoois peptídicos de fórmula geral



que consiste

a) em ligar um aminoácido apropriadamente protegido correspondente ao aminoácido  $A_9$  a um suporte de resina activada,

b) em ligar em seguida, os outros aminoácidos alfa-amino-protectidos, em sequência, do terminal carboxilo ao terminal amino,  $A_8$  até  $A_1$ , para a extremidade amino-terminal da cadeia peptídica em crescimento que, entretanto, foi exposta por eliminação dos grupos amino-protectores, e

c) em tratar finalmente o péptido ligado à resina com cerca de 2 equivalentes de amino-álcool com terminal carboxilo correspondente ao símbolo  $A_{10}-ol$  e com cerca de 1 equivalente de ácido acético em diclorometano para separar o polipeptido da resina e em ligar, simultaneamente, o álcool peptídico de terminal carboxi-

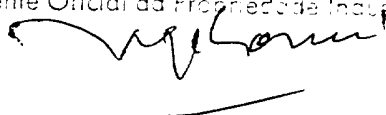


4.

lo ao péptido para se obter, deste modo, o álcool peptídico desejado.

Os álcoois peptídicos assim obtidos têm acção anticoagulante.

Lisboa, 9 de Maio de 1989  
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. L. Costa', is written over the typed name of the official. Below the signature is a horizontal line.