

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.582

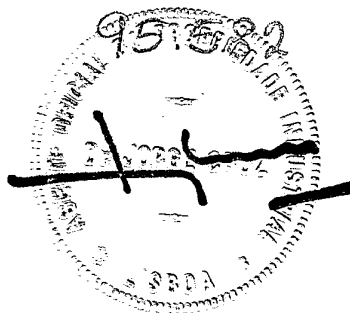
REQUERENTE: MERCK & CO., INC., norte-americana, industrial, com sede em Rahway, New Jersey 07065-0906, Estados Unidos da América do Norte

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS PEPTIDICOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DO FIBRINOGENIO"

INVENTORES: Ruth F. Nutt, Stephen F. Brady, Daniel F. Veber e Mark E. Duggan

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

Estados Unidos da América do Norte, 13 de Outubro 1989, No.421,224



MERCK & CO., INC.

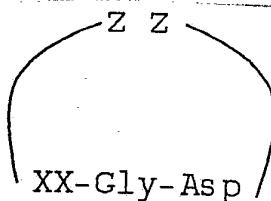
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS PEPTÍDICOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DO FIBRINOGENÍO"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

RESUMO

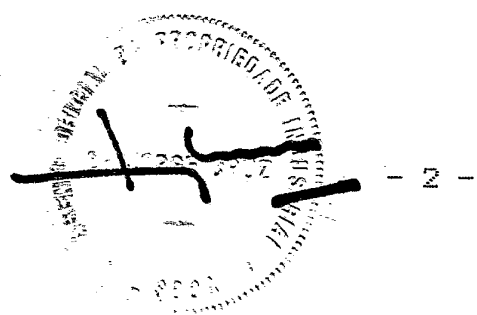
O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de um antagonista do receptor do fibrinogénio, nomeadamente da fórmula:



em que XX representa um alfa-aminoácido sintético contendo uma cadeia lateral linear e ZZ representa uma sequência de 1, 2, 3 ou 4 quatro aminoácidos.

O referido processo consiste em:

- a) acoplamento do aminoácido de terminal carboxi, tendo o seu grupo alfa-amino adequadamente protegido, com uma resina de poliestireno clorometilada;
- b) remoção do grupo protector do alfa-amino;



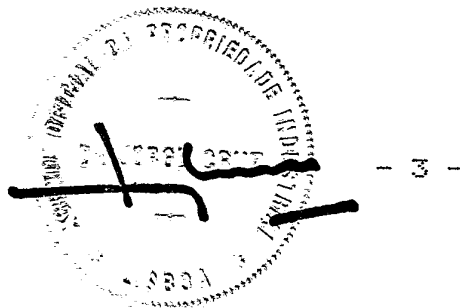
c) adição do derivado protegido na cadeia lateral e no amino do aminoácido que se segue na sequência e de um agente de acoplamento por condensação, à resina, e acoplamento do aminoácido que se segue na sequência ao aminoácido previamente acoplado;

d) repetição do passo (c) na ordem sequencial desejada de aminoácidos de modo a obter um intermediário peptídico acoplado à resina;

e) remoção do intermediário peptídico a partir da resina e dos grupos protectores da cadeia lateral restantes;

e

f) ciclização do intermediário peptídico.

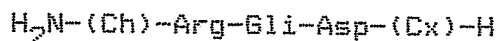


FUNDAMENTO DO INVENTO

Este invento está relacionado com compostos para inibição da ligação do fibrinogénio às plaquetas sanguíneas e para a inibição da agregação de plaquetas sanguíneas.

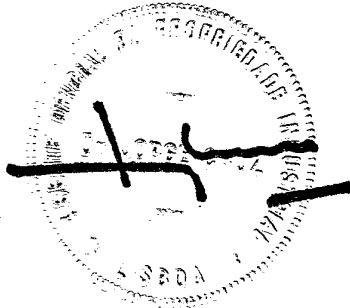
O fibrinogénio é uma glicoproteína, presente no plasma do sangue, que participa na agregação de plaquetas e formação de fibrina. As plaquetas são fragmentos anucleados tipo célula, encontrados no sangue de todos os mamíferos, que participam na coagulação do sangue. Sabe-se que a interacção do fibrinogénio com um receptor no complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana das plaquetas é essencial para a função normal das plaquetas.

Zimmerman et al., Patente U.S. Nº 4, 683, 291 descreve peptídeos com utilidade no estudo das interacções fibrinogénio-plaqueta, plaqueta-plaqueta e célula-célula. Os peptídeos estão descritos como tendo utilidade onde é desejável retardar ou evitar a formação de um trombus ou coágulo no sangue. A fórmula geral para os peptídeos é:



onde Ch e Cx são sequências de aminoácidos.

Pierschbacher et al., Patente U.S. Nº 4,589,881, descreve a sequência de um fragmento polipeptídico de 11,5 kDa da fibronectina que representa a actividade promotora da aderência celular da fibronectina. Um fragmento especificamente descrito é:



H-Tir-Ala-Val-Tre-Gli-Arg-Gli-Asp-
Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Lis-Pro-Ile-
Ser-Ile-Asn-Tir-Arg-Tre-Glu-Ile-
Asp-Lis-Pro-Ser-Gln-Met-OH

Ruoslahti et al., Patente U.S. Nº 4,614,517 descreve tetrapeptídeos que alteram a actividade de aderência celular de células a vários substratos. Estabeleceu-se que os peptídeos «consistem essencialmente» na seguinte sequência:

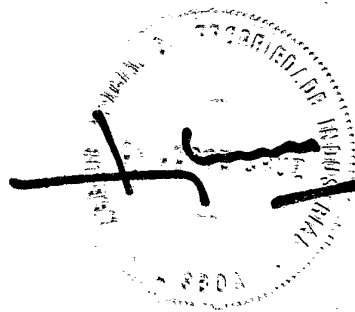
X-Arg-Gli-Asp-Ser-Y

em que X é H ou um ou mais aminoácidos. A Figura 1 enumera os polipeptídeos que foram sintetizados por Ruoslahti et al. na «determinação do peptídeo mais pequeno apresentando actividade de aderência celular».

Ruoslahti et al., Patente U.S. Nº4,578,079, descreve tetrapeptídeos semelhantes tendo Ser substituída por Tre ou Cis.

Pierschbacher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp. 5985-5988, Outubro de 1984, descreve variantes do sítio de reconhecimento celular da fibronectina que retêm a actividade promotora do crescimento. Eles testaram as actividades promotoras da aderência celular de uma série de estruturas muito parecidas com o peptídeo Arg-Gli-Asp-Ser e encontrou-se «que os resíduos de arginina, glicina e aspartato não podem ser substituídos mesmo por aminoácidos estreitamente relacionados, mas que vários aminoácidos podem substituir serina sem perda de actividade».

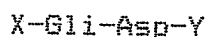
Ruoslahti et al., Science, Vol. 238, pp. 491-497, discutem as proteínas de adesão celular. Eles estabelecem



especificamente que a «elucidação da sequência de aminoácidos do domínio de aderência celular na fibronectina e sua duplicação com peptídeos sintéticos estabelece a sequência Arg-Gli-Asp (RGD) como a estrutura essencial reconhecida pelas células na fibronectina».

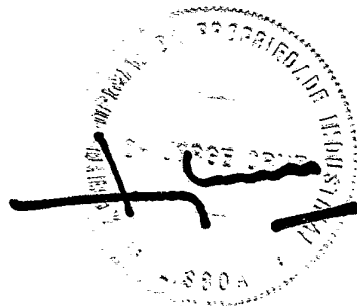
Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pp. 6471-6475, Setembro 1987, descreve o receptor de adesão dirigido por Arg-Gli-Asp envolvido na ligação ao fibrinogénio e ao Factor de von Willebrand.

Adams et al., Patente U.S. Nº 4,857,508 descreve os tetrapeptídeos que inibem a agregação de plaquetas e a formação de um trombus. Os tetrapeptídeos têm a fórmula:



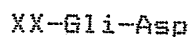
em que X pode ser $\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{Z})\text{COOH}$ ou Ac-Arg, em que Z=H, NH_2 ou NH-Acíl e $n=1-4$, e em que Y pode ser Tir- NH_2 , Fen- NH_2 ou um grupo de uma fórmula especificamente definida.

Os requerentes descobriram antagonistas do receptor do fibrinogénio que não contêm a sequência de aminoácidos Arg-Gli-Asp que é descrita na literatura como sendo especificamente necessária para a ligação ao complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana das plaquetas.

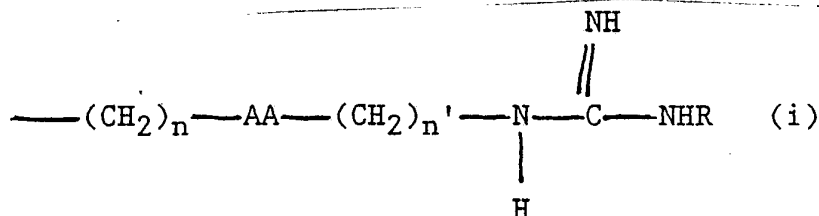


SUMARIO DO INVENTO

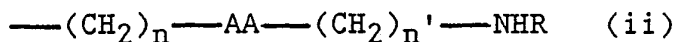
Os compostos do presente invento inibem a ligação do fibrinogénio ao receptor complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana das plaquetas e contêm uma sequência de aminoácidos:



em que XX é um alfa-aminoácido sintético contendo uma cadeia lateral linear.



ou



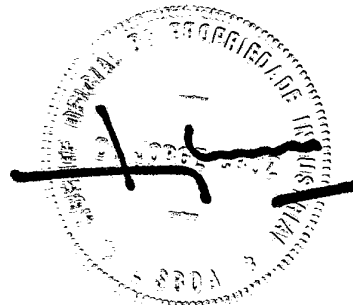
em que:

n é 1,2,3 ou 4;

n' é 2,3 ou 4;

AA é um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre ou uma ligação simples; e

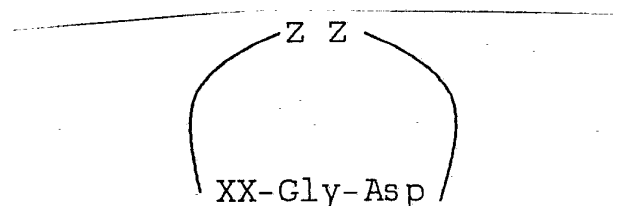
R é H, alquilo C₁₋₆, arilo substituído não substituído, arilmetilo substituído ou não substituído ou cicloalquilo substituído ou não substituído, desde que no caso (i), quando AA for uma ligação simples e R for H, então n+n' não iguale 1, 2, 3 ou 4.



Estes compostos são surpreendentes pois os trabalhos anteriores que ensinam que a sequência Arg-Gli-Asp é necessária para se conseguir a ligação ao receptor IIb/IIIa.

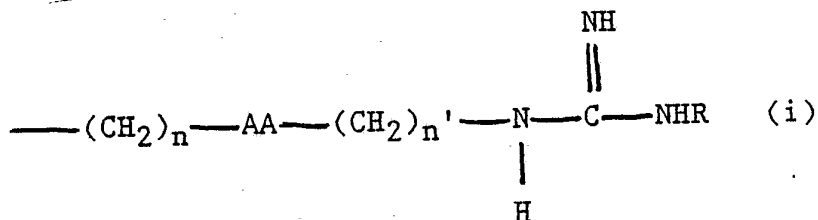
São compostos preferidos do invento os que têm selectividade relativamente aos receptores integrina. Os compostos preferidos incluem aqueles em que XX é alfa-aminoácido sintético contendo uma cadeia lateral linear com um grupo amina, conforme representado acima por (ii).

O presente invento é um antagonista do receptor do fibrinogénio tendo a seguinte estrutura:

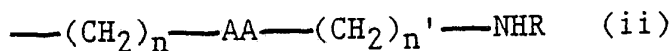
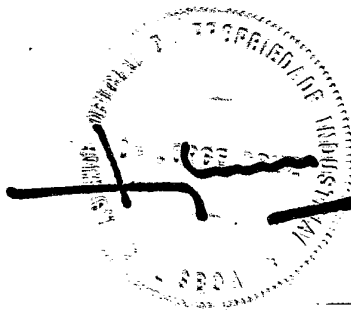


em que XX representa um α -aminoácido sintético como definido abaixo e ZZ representa a sequência de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos como definido abaixo.

XX partilha uma ligação amida com Gli e uma ligação amida com ZZ e é definido como tendo uma cadeia lateral X



ou



em que:

n é 1, 2, 3 ou 4;

n' é 2, 3 ou 4;

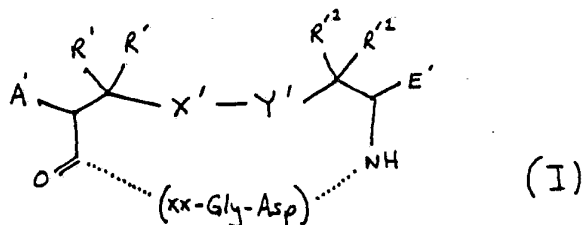
AA é um átomo de oxigênio, um átomo de enxofre ou uma ligação simples; e

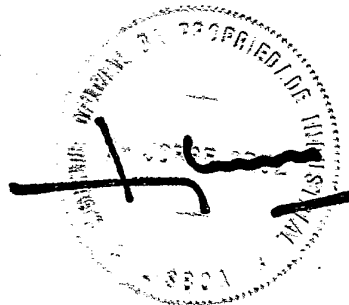
R é H, alquilo C₁₋₆, arilo substituído ou não substituído, arilmetilo substituído ou não substituído ou cicloalquilo substituído ou não substituído, desde que no caso (i), quando AA for uma ligação simples e R for H, então n+n' não iguale 1, 2, 3 ou 4.

De preferência, quando X for definido por (i), então n+n' é 3, AA é uma ligação simples e R é fenilo ou benzilo.

De preferência, quando X for definido por (ii), então n+n' é 5, AA é uma ligação simples e R é H.

ZZ é como definido abaixo:





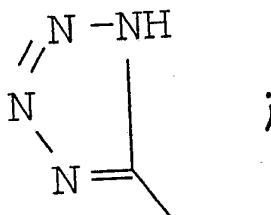
em que:

A' é H, acilamido, acilaminoacilamido, acilamino-N-metilamino-acilamido;

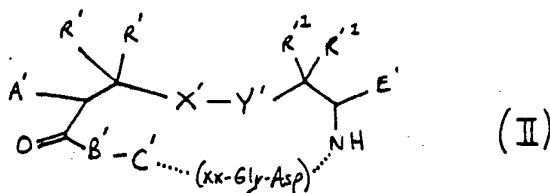
R' e R'¹ são independentemente H, metilo, etilo ou um grupo alquilo inferior tendo 1 a 5 carbonos;

X'-Y' é S-S, CH₂-S, S-CH₂, CH₂CH₂, CH₂, CH₂CH₂CH₂, CH₂-S-S, CH₂-S-S-CH₂, S-S-CH₂; e

E' é H, COOH, CONH₂, CONHR², CONR^{3,4}, CH₂OH, CO₂R², CH³ em que R² é um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono, R^{3,4} é um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono ou NR^{3,4} é um aminoácido secundário, ou



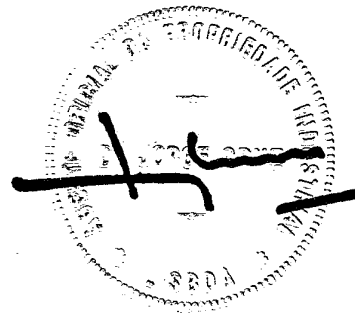
ou ZZ é



em que:

A' é como definido atrás;

R' e R'¹ são como definidos atrás;



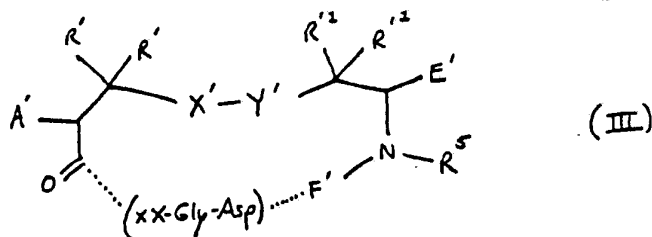
X' - Y' é como definido atrás;

B' é um D- ou L- α -aminoácido;

C' é um D- ou L- α -aminoácido secundário de preferência seleccionado de entre prolina, β -metilprolina, β,β -dimetilprolina, gama-hidroxi-prolina, anidroprolina, tioproli-na, β -metiltioprolina, β,β -dimetiltioprolina, ácido pipecólico, azetidina-ácido carboxílico e um N-metil-aminoácido ou D- ou L- α -aminoácido primário; e

E' é como definido atrás;

ou ZZ é



em que:

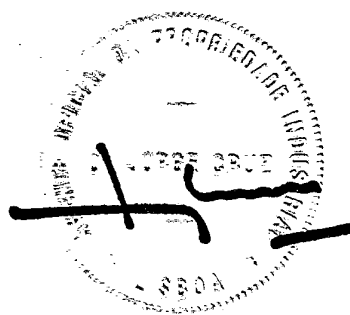
A' é como definido atrás;

R' e R'¹ são como definidos atrás;

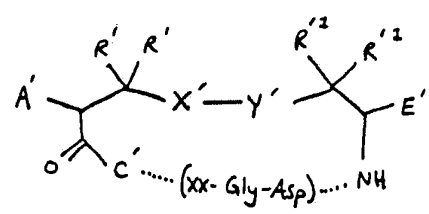
X' - Y' são como definidos atrás;

E' é como definido atrás;

F' é um L-aminoácido, de preferência um L-aminoácido seleccionado entre triptofano, fenilalanina, leucina, valina, isoleucina, α -naftilalanina, β -naftilalanina, metionina, tirosina, arginina, lisina, homoarginina, ornitina, histidina, triptofano substituído, fenilalanina substituída ou tirosina substituída; e Rr⁵ é H ou metilo;



ou ZZ é

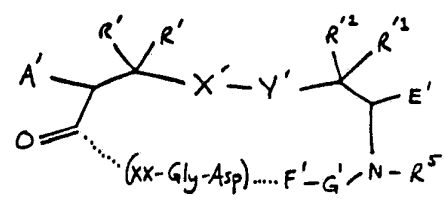


IV

em que

- A' é como definido atrás;
- R' e R'¹ são como definidos atrás;
- X' - Y' é como definido atrás;
- C' é como definido atrás; e
- E' é como definido atrás.

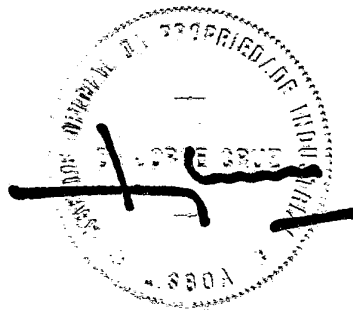
ou ZZ é



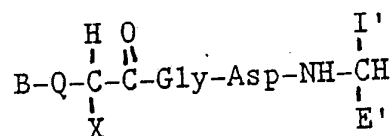
V

em que

- A' é como definido atrás;
- R' e R'¹ são como definidos atrás;
- X' - Y' é como definido atrás;
- F' é como definido atrás;
- G' é como um D- ou L-α-aminoácido, aminoácido cíclico secundário ou N-metilaminoácido;
- E' é como definido atrás; e
- R⁵ é como definido atrás.



O presente invento também é um antagonista do receptor do fibrinogénio da fórmula



em que:

B representa zero, um ou dois aminoácidos substituídos ou não substituídos;

Q representa H, NH, NH₂ ou Ac-NH;

I' representa uma cadeia lateral de um aminoácido definido por F';

E' é como definido atrás; e

X representa a cadeia lateral de aminoácido XX como previamente definido;

desde que quando B for zero aminoácidos substituídos ou não substituídos, então Q é H, NH₂ ou Ac-NH e que quando B for um ou mais aminoácidos substituídos ou não substituídos, então Q é NH.

São exemplos de compostos do presente invento:

Ac-(Arg(Ph))-Gly-Asp-Phe;

Ac-(Arg(Bzl))-Gly-Asp-Phe;

Aha-Gly-Asp-Phe;



Aha-Gly-Asp-Trp;

Ac-Cys-Asn-(DiMeTzl)-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-(DiMeTzl)-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

(GuaValA)-Gly-Asp-Phe;



(GuaValA)-Gly-Asp-Trp;

(GuaHexA)-Gly-Asp-Trp;

(GuaHepA)-Gly-Asp-Trp;

(7-AhepA)-Gly-Asp-Trp;

(8-AoctA)-Gly-Asp-Trp;

H₂N  S  Gly-Asp-Phe;

Ac-Cys-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Pen-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-(Arg(Phenyl))-Gly-Asp-Cys-OH;

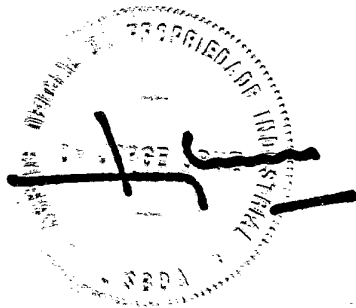
Ac-Cys-(Arg(Benzyl))-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Cys-OH;

Ac-Cys-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-(N-MeCys)-OH;

Ac-Cys-Arg-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH₂;



c((7-AhepA)-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Pro);

c((6-AhexA)-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Pro);

c((7-AhepA)-(homoLys)-Gly-Asp-(beta-Nal)-Pro);

c((7-AhepA)-(Arg(Phenyl))-Gly-Asp-Trp-Pro);

c((7-AhepA)-(Arg(Benzyl))-Gly-Asp-Trp-Pro);

Ac-Cys-Asn-Pro-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Pen-Asn-(DiMeTzl)-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-Asn-Pro-(Arg(Phenyl))-Gly-Asp-Cys-OH;

Ac-Cys-Asn-(DiMeTzl)-(Arg(Phenyl))-Gly-Asp-Cys-OH;

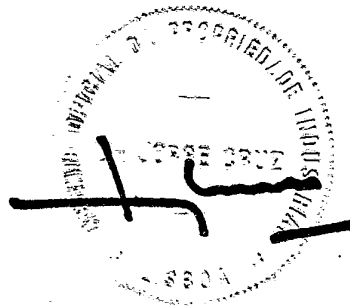
Ac-Cys-Asn-(DiMeTzl)-(Arg(Benzyl))-Gly-Asp-Cys-OH; and

c(Aha-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Pro).

Os compostos preferidos são:

Ac-Cys-Asn-(DiMetzl)-(homoLys)-Gly-Asp-Cys-OH; and

c(Aha-(homoLys)-Gly-Asp-Trp-Pro)

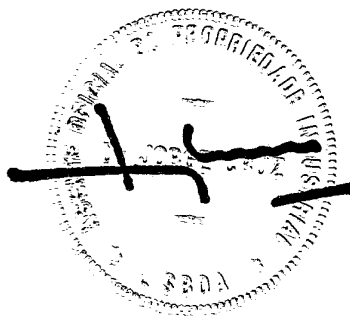


Além das abreviaturas habituais de três letras usadas para identificar aminoácidos comuns, os requerentes usaram as seguintes designações de abreviaturas:

homoLys	homo-lisina
Aha, 7-Ahepa	ácido 7-amino-heptanóico
Arg (Ph)	fenilarginina
Arg (Bzl)	benzilarginina
DiMeTzl	dimetiltioprolina
AhexA	ácido 6-amino-hexanóico
AoctA	ácido 8-amino-octanóico
GuaValA	ácido 5-guanidovalérico
GuaHexA	ácido 6-guanido-hexanóico
GuaHepA	ácido 7-guanido-heptanóico
beta-Nal	beta-naftilalanina

O invento também inclui composições, compreendendo peptídeos antagonistas do receptor do fibrinogénio do presente invento e um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, e.g. soro fisiológico, a um pH farmacologicamente aceitável, e.g. 7,4, que sejam adequados a administração intravenosa contínua ou oral ou bolus intravenoso para promover a inibição da agregação de plaquetas.

O invento também inclui métodos para inibição da agregação de plaquetas que se caracterizam pela administração a um paciente de uma quantidade eficaz de uma composição do presente invento por um método intravenoso contínuo ou oral ou um bolus intravenoso.



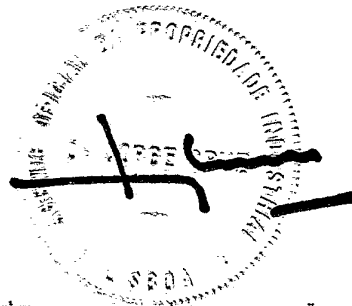
DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Os compostos do presente invento são antagonistas do receptor do fibrinogênio que inibem a agregação de plaquetas induzida pelo fibrinogênio. Estes compostos são preparados por síntese em fase sólida que é bem conhecida na especialidade ou pelo método líquido igualmente bem conhecido (Neurath, Hill & Boeder, Eds. «The Proteins» 3ª Edição, Vol II, Academic Press, 1976).

Os compostos do invento são especificamente úteis na prevenção da formação de coágulos pela inibição da ligação do fibrinogênio ao receptor complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana de plaquetas. Os compostos preferidos têm selectividade relativamente a outros receptores de integrinas e são portanto especificamente destinados a prevenir trombose.

Os processos para a síntese de aminoácidos sintéticos definidos por XX tais como homolisina, ácido 7-amino-heptanóico, fenilarginina, ácido 5-guanidovalérico e benzilarginina são bem conhecidos. A síntese de DL-homolis está descrita, por exemplo, em Payne, Synthetic Comm. 15 (14), pp 1277-1290 (1985). Os processos de guanilação estão descritos, por exemplo, em Methods of Enzymology, 256, 558 (1972), e em A.E. Miller e J.J. Bischoff, Synthesis, pp. 777-779 (1986).

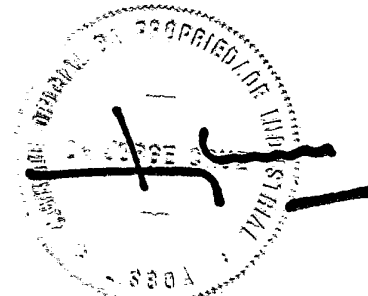
Os compostos do invento podem ser preparados usando síntese de peptídeos em fase sólida, por exemplo como descrito por Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1964), se bem que também possam ser usadas outras sínteses químicas equivalentes conhecidas, como sejam as sínteses de Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5132 (1985). A síntese em fase sólida começa no extremo C do peptídeo pelo acoplamento de um aminoácido protegido a uma



resina adequada, como estabelecido de um modo geral na Patente U.S. Nº 4,244,946 de Rivier et al, publicado em 21 de Janeiro de 1982, a descrição da qualé aqui incluída como referência. O método em solução pode ser usado como descrito por Neurath et al. Capítulo 2, pp. 106-253. Exemplos de síntese deste tipo geral estão descritos nas Patentes U.S. 4,305,872 e 4,316,891.

Na síntese destes polipeptídeos, o aminoácido do extremo carbonilo, tendo o seu grupo alfa-amino adequadamente protegido, foi covalentemente acoplado a uma resina polistireno clorometilada ou similares, como seja p-hidroximetilfenilacetilamidometilresina (resina PAM). A resina polistireno clorometilada é composta por esferas finas (20-70 microns de diâmetro) de uma resina sintética preparada por copolimerização do estireno com 1 a 2 por cento de divinilbenzeno. Os anéis de benzeno na resina são clorometilados numa reacção de Friedel-Crafts com éter metílico de clorometilo e cloreto estânico. A reacção de Friedel-Crafts continuou até a resina conter 0,5 a 5 mmoles de cloro por grama de resina. Após remoção do grupo protector de de alfa-amina, como seja pela utilização de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno, o derivado com amina protegida do aminoácido seguinte na sequência é adicionado juntamente com um agente de condensação como seja diciclo-hexilcarbodiimida. Os restantes aminoácidos protegidos em alfa-amina e nas cadeias laterais são então acoplados por passos de condensação na ordem pretendida para se obter um composto intermédio ligado à resina.

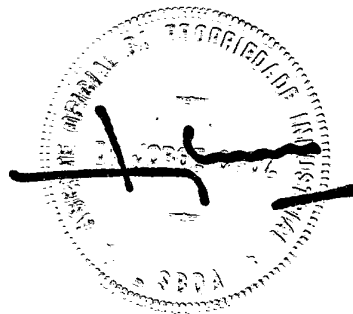
A condensação entre dois aminoácidos, ou um aminoácido e um peptídeo, ou um peptídeo e um peptídeo pode ser efectuada de acordo com os métodos de condensação habituais como seja o método de azida, método de anidrido ácido misto, método DCC (diciclo-hexil-carbodiimida), método BOP (benzotriazole-1-iloxitris (dimetil-amino) fosfónio hexafluorofosfato, método de éster activo (método



do éster p-nitrofenílico, método do éster N-hidroxi-succinimido, método do éster cianometílico, etc.), método K do reagente de Woodward, método do carbonildiimidazol, método de oxidação-redução. No caso da elongação da cadeia peptídica no método de fase sólida, o peptídeo é ligado a um veículo insolúvel no aminoácido C-terminal. Como veículos insolúveis podem ser usados os que reagem com o grupo carbonilo do aminoácido C-terminal para formar uma ligação que é facilmente clivada mais tarde, por exemplo, resina halometilada como seja resina clorometilada e resina bromometilada, resina hidroximetilada, resina aminometilada, benzidirlamina-resina e t-alquiloxicarbonil-hidrazida.

É comum à síntese química de peptídeos a protecção dos grupos reactivos das cadeias laterais das várias fracções de aminoácidos com grupos protectores adequados até o grupo ser finalmente removido após a cadeia estar totalmente montada. Também é comum a protecção do grupo alfa-amina num aminoácido ou num fragmento enquanto a entidade reage no grupo carboxilo seguido da remoção selectiva do grupo protector de alfa-amina para permitir que nesse local se desenrole a reacção subsequente. Assim, é comum que, como um passo na síntese, seja produzido um composto intermediário que inclua cada um dos resíduos de aminoácidos posicionados na sequência pretendida na cadeia peptídica com vários destes resíduos tendo grupos protectores das cadeias laterais. Estes grupos protectores são então removidos substancialmente ao mesmo tempo de modo a produzir o produto resultante após purificação.

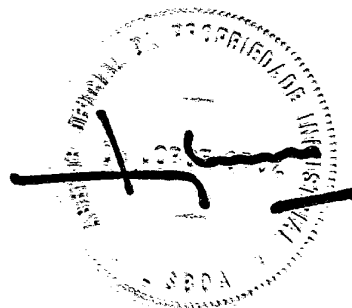
Os grupos protectores aplicáveis na protecção de grupos amina de cadeias laterais alfa e omega são exemplificados como benziloxicarbonilo (daqui em diante abreviado como Z), isonicotiloxicarbonilo (iNOC), O-clorobenziloxicarbonilo [Z(2Cl)], p-nitrobenziloxicarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxobenziloxicarbonilo



[Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 2-(4-bifenil)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfinotioilo (Ppt), dimetilfosfinotioilo (Mpt) e similares.

Grupos protectores do grupo carbonilo incluem, por exemplo, éster benzílico (OBzl), éster ciclo-hexílico (Chx), éster 4-nitrobenzílico (Onb), éster t-butílico (OBut), éster 4-pirimidilmetílico (OPic) e similares. É desejável que aminoácidos específicos tais como arginina, cisteína e serina possuindo um grupo funcional diferente de grupos amina ou carboxilo estejam protegidos por um grupo protector adequado conforme for necessário. Por exemplo o grupo guanidino na arginina pode ser protegido com nitro, p-tolueno-sulfonilo, benziloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p-metoxibenzenossulfonilo, 4-metoxi-2, 6-dimetilbenzenossulfonilo (Mds), 1,3,5-trimetilfenilsulfonilo (Mts) e similares. O grupo tiol na cisteína pode ser protegido com benzilo, p-metoxibenzilo, trifenilmetilo, acetilamidometilo, etilcarbamoilo, 4-metilbenzilo, 2,4,6-trimetilbenzilo (Tmb) etc., e o grupo hidroxilo em serina pode ser protegido com benzilo, t-butilo, acetilo, tetra-hidropiranilo etc.

Stewart e Young, «Solid Phase Peptide Synthesis» Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984) proporciona informação detalhada relativamente a processos para a preparação de peptídeos. A protecção dos grupos α -amina está descrita nas páginas 14-18 e o bloqueamento das cadeias laterais está descrito nas páginas 18-28. Nas páginas 149-151 está representada uma tabela de grupos protectores das funções amina, hidroxilo e sulfidriilo. Estas descrições são aqui incluídas como referências.



Após completada a sequência de aminoácidos pretendida, o peptídeo intermediário é removido do suporte de resina por tratamento com um reagente, como seja HF líquido, que não só cliva o peptídeo da resina, como também cliva todos os restantes grupos protectores da cadeia lateral que não interfiram na reacção de ciclização. Os grupos das cadeias laterais potencialmente reactivos são protegidos com grupos bloqueadores que são estáveis ao HF. Os peptídeos são tornados cíclicos através de um de vários métodos conhecidos (ver Scroder e Lubke, «The Peptides: Methods of Peptide Synthesis» Vol. I., Academic Press, New York (1965), pp. 271-286, cujo conteúdo é aqui incluído como referência), e.g. por formação de uma ligação dissulfureto entre os resíduos de cisteína usando iodo em AcOH ou oxidação ao ar a pH 8 em tampão NH_4 OAc. O polipeptídeo pode ser então purificado por cromatografia de permeação em gel seguido de HPLC preparativa, como descrito em Rivier et al., Peptides: Structure and Biological Function (1979) pp. 125-128.

EXEMPLO 1

Síntese de

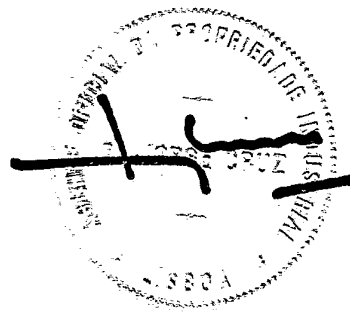
Ac-Cis(Fmb)-Asn-(DiMeTzl)-(homoLis(Cbz))-Gli-Asp(Bzl)-Cis(Fmb)-O

Pam R e finalmente

Ac-Cis-Asn-(DiMeTzl)-(homoLis)-Gli-Asp-Cis-OH

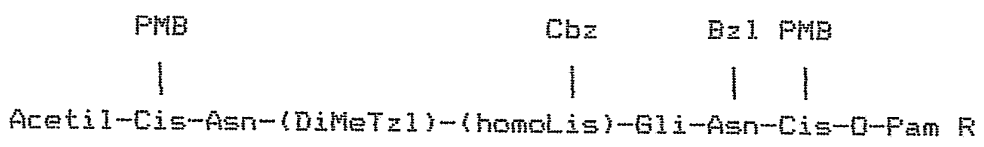
PMB

Começando com a resina Boc-Cis-O-Pam, o grupo protector Boc de alfa-amina (tert-butilcarbonil) foi removido (ao mesmo tempo que a cadeia lateral de Cis permanece protegida por p-metilbenzilo) usando ácido trifluoroacético e cloreto de metileno e a cisteína α -desprotegida neutralizada com diisopropiletilamina. Asp (benzil) (Asp (Bzl)) protegida com Boc foi então acoplada a

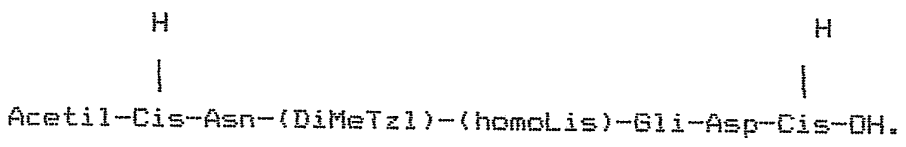


cisteína mediado por diciclo-hexilcarbodiimida e desprotegida com ácido trifluoroacético e cloreto de metileno. Asp foi então neutralizada com diisopropiletilamina. Após este processo de acoplagem realizado passo por passo com diciclo-hexilcarbodiimida, a desprotecção com ácido trifluoroacético e cloreto de metileno e neutralização com diisopropiletilamina, os resíduos Gli protegida com Boc, homoLis(Cbz) DiMeTzl, Asn, Cis(Pmb) foram acoplados sucessivamente. A Cis final foi então acetilada com ácido acético anidro.

Após acetilação, formou-se a seguinte peptideo-resina:



A clivagem do peptideo da resina é conseguida usando HF/anisole (9:1 (v/v)) para formar:



Formou-se uma estrutura cíclica por formação de uma ponte dissulfureto entre os resíduos cisteína. O peptideo foi dissolvido em 50-80% de AcOH:H₂O à temperatura ambiente e a solução agitada durante a rápida adição de uma solução de iodo em AcOH para uma concentração final de 2,25 mg/ml de iodo. Após 1-2 horas de tempo de reacção, o excesso de I₂ e de AcOH foram removidos por evaporação rotativa sob vácuo e a solução aquosa contendo o peptideo tornado cíclico foi purificado usando HPLC preparativa num gradiente de 0,1% TFA H₂O-CH₃CN sendo os D- e L-diastereómeros separados por meios convencionais. O produto final sal de TFA foi convertido em sal de HOAc por passagem



através de uma coluna de permuta iónica BioRad AG3-X4A (ciclo actato). O peptídeo acabado é:

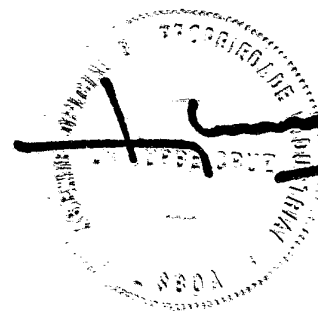
Acetil-Cis-Asn-(DiMeTzl)-(homoLis)-Gli-Asp-Cis-OH.

Como alternativa à formação de dissulfureto por oxidação com iodo, o peptídeo com SH livre foi dissolvido em 1-5% HOAc numa concentração de aproximadamente 2mg/ml e a solução foi ajustada a aproximadamente pH 7-8,5 com NH_4OH concentrado. A ciclização foi conseguida sob agitação forte (de preferência com um pedaço pequeno arame de cobre adicionado para acelerar a reacção) durante um período de 1-4 horas a 25°C. A mistura de reacção foi então concentrada como anteriormente e o produto purificado por HPLC preparativa.

Utilidade Terapêutica

O composto do invento pode ser administrado a doentes em que se pretenda prevenção de trombose por inibição da ligação do fibrinogénio ao receptor complexo de glicoproteínas IIb/IIIa da membrana de plaquetas. Eles são úteis em cirurgia nas artérias periféricas (enxertos de artérias, endarterectomia das carótidas) e em cirurgia cardiovascular em que a manipulação de artérias e órgãos, e/ou a interacção de plaquetas com superfícies artificiais, conduza à agregação e consumo de plaquetas. As plaquetas agregadas podem formar coágulos e tromboembolias. Os polipeptídeos do invento podem ser administrados a estes doentes que sofrem intervenções cirúrgicas para evitar a formação de trombos e de tromboembolias.

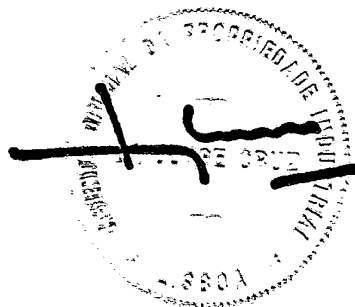
A circulação extracorporal é de rotina usada na cirurgia cardiovascular para oxigenar o sangue. As plaquetas aderem às



superfícies do circuito extracorporal. A adesão está dependente da interacção entre GPIIb/IIIa nas membranas de plaquetas e o fibrinogénio adsorvido à superfície do circuito. (Gluszko et al., Amer. J. Physiol., 1987, 252:H, pp 615-621). As plaquetas libertadas de superfícies artificiais apresentam a função hemostática inibida. Os polipeptídeos do invento podem ser administrados para evitar adesão.

Outras aplicações destes polipeptídeos incluem prevenção da trombose de plaquetas, tromboembolismo e reoclusão durante e após terapia trombolítica e prevenção da trombose de plaquetas, tromboembolismo e reoclusão após angioplastia das artérias coronárias e de outras artérias e após processos de «bypass» das artérias coronárias. Os polipeptídeos do invento podem também ser usados para evitar enferte do miocárdio.

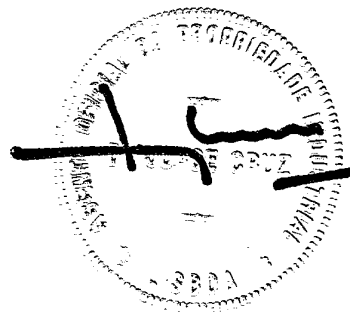
Estes polipeptídeos podem ser administrados por quaisquer meios convenientes que resultarão na sua libertação para a corrente sanguínea numa quantidade substancial incluindo injeção intravenosa contínua ou injeção de bolus ou métodos orais. As composições do invento incluem peptídeos do invento e veículos farmacologicamente aceitáveis, e.g. soro fisiológico, a um pH adequado, e.g. 7,4, para se conseguir a inibição da agregação de plaquetas. Eles podem ser combinados com agentes trombolíticos tais como activadores do plasminogénio ou estreptoquinase de modo a inibir a agregação de plaquetas. Eles podem também ser combinados com anticoagulantes tais como heparina, aspirina ou cumarina. A administração intravenosa está presentemente contemplada como a via de administração preferida. Eles são solúveis em água e podem portanto ser eficazmente administrados em solução. Num exemplo de aplicação, uma quantidade adequada do peptídeo é administrada intravenosamente a uma vítima de ataque cardíaco a sr sujeita a angioplastia. A administração ocorre durante vários minutos antes



da angioplastia e é numa quantidade suficiente para inibir a agregação de plaquetas, e.g. uma quantidade que consiga um nível estacionário de concentração no plasma entre cerca de 0,05-30 μM por quilo, de preferência entre cerca de 0,3-3 μM por quilo. Quando esta quantidade é atingida, mantém-se uma infusão entre cerca de 1-100 nM por quilo por min., de preferência entre cerca de 10-30 nM por quilo por min. para inibir a agregação de plaquetas. Se o doente necessitar de fazer cirurgia de «bypass», a administração pode ser parada imediatamente e não causará complicações durante a cirurgia que seriam causadas por outros materiais tais como aspirina ou anticorpos monoclonais, Os efeitos dos quais duram horas após cessar a administração.

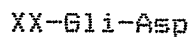
O presente invento também inclui uma composição farmacêutica compreendendo peptídeos do presente invento e activador do plasminogénio tipo tecido ou estreptoquinase. O invento também inclui um método para promover a trombólise e prevenir a reoclusão num doente, o qual se caracteriza pela administração a um doente de uma quantidade eficaz das composições do invento.

O presente invento pode tomar outras formas específicas sem se afastar do seu espírito ou atributos essenciais. Assim, os exemplos específicos descritos atrás não deverão ser interpretados como limitantes do âmbito do presente invento.

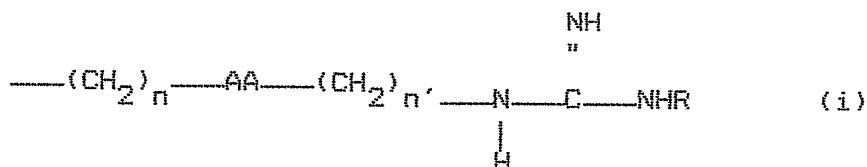


REIVINDICAÇÕES:

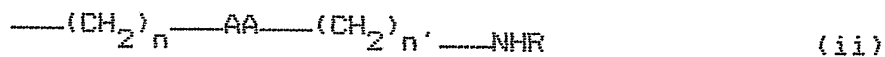
18. - Processo para a preparação de um antagonista do receptor do fibrinogénio com a fórmula que se segue:



em que XX representa um alfa-aminoácido sintético contendo uma cadeia lateral linear definida como



ou



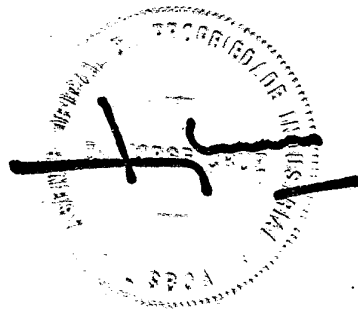
em que:

n é 1, 2, 3 ou 4;

n' é 2, 3 ou 4;

AA é um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre ou uma ligação simples; e

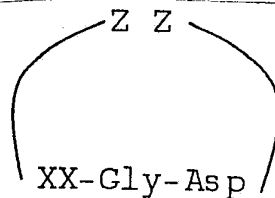
R é H, alquilo C₁₋₆, arilo substituído ou não substituído, arilmetilo substituído ou não substituído ou cicloalquilo substituído ou não substituído, desde que no caso (i), quando AA é uma ligação simples e R é H, então n+n' não é igual a 1, 2, 3 ou 4;

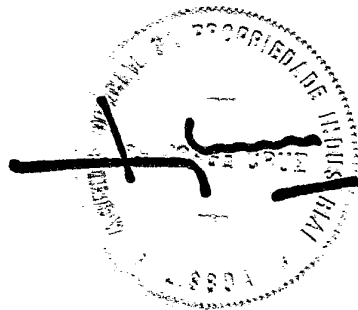


caracterizado por compreender:

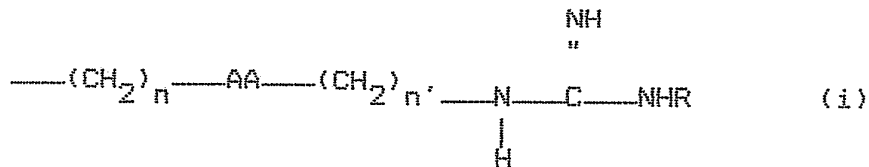
- a) o acoplamento do aminoácido de terminal carboxi, tendo o seu grupo alfa-amino adequadamente protegido, com uma resina de poliestireno clorometilada;
- b) a remoção do grupo protector do alfa-amino;
- c) a adição do derivado protegido na cadeia lateral e no amino do aminoácido que se segue na sequência e de um agente de acoplamento por condensação, à resina, e o acoplamento do aminoácido que se segue na sequência ao aminoácido previamente acoplado;
- d) a repetição do passo (c) na ordem sequencial desejada de aminoácidos de modo a obter um intermediário peptídico acoplado à resina;
- e) a remoção do intermediário peptídico a partir da resina e dos grupos protectores da cadeia lateral restantes; e
- f) a ciclização do intermediário peptídico.

2ª. - Processo para a preparação de um antagonista do receptor do fibrinogénio da fórmula:





em que XX representa um alfa aminoácido sintético tendo uma cadeia lateral contendo uma cadeia lateral linear definida como



ou



em que:

n é 1, 2, 3 ou 4;

n' é 2, 3 ou 4;

AA é um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre ou uma ligação simples; e

R é H, alquilo C₁₋₆, arilo substituído ou não substituído, arilmetilo substituído ou não substituído ou cicloalquilo substituído ou não substituído, desde que no caso (i), quando AA é uma ligação simples e R é H, então n+n' não é igual a 1, 2, 3 ou 4,

e ZZ representa uma sequência de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos substituídos ou não substituídos;

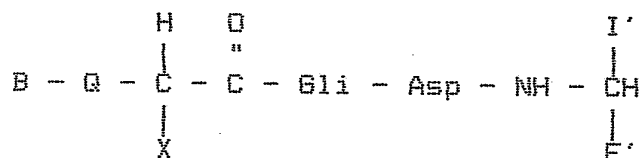
caracterizado por compreender:

- a) o acoplamento do aminoácido de terminal carboxi, tendo o seu grupo alfa-amino adequadamente protegido, com uma resina de poliestireno clorometilada;
- b) a remoção do grupo protector do alfa-amino;

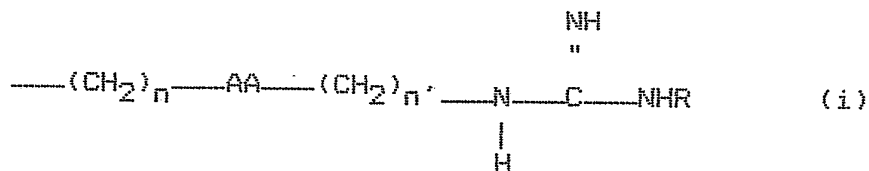


- c) a adição do derivado protegido na cadeia lateral e no amino do aminoácido que se segue na sequência e de um agente de acoplamento por condensação, à resina, e o acoplamento do aminoácido que se segue na sequência ao aminoácido previamente acoplado;
- d) a repetição do passo (c) na ordem sequencial desejada de aminoácidos de modo a obter um intermediário peptídico acoplado à resina;
- e) a remoção do intermediário peptídico a partir da resina e dos grupos protectores da cadeia lateral restantes; e
- f) a ciclização do intermediário peptídico.

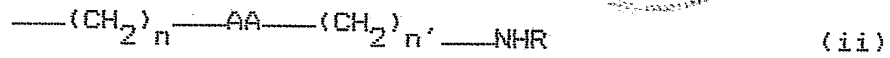
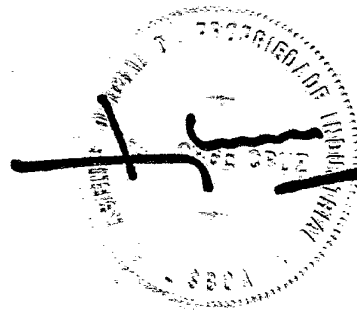
3a. - Processo para a preparação de um antagonista do receptor do fibrinogénio da fórmula:



em que B representa zero, um ou dois aminoácidos substituídos ou não substituídos; Q representa H, NH, NH₂ ou Ac-NH; X representa uma cadeia lateral de aminoácido definida como



ou



em que:

n é 1, 2, 3 ou 4;

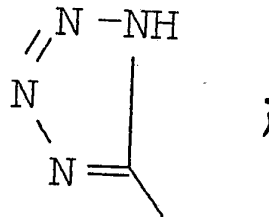
n' é 2, 3 ou 4;

AA é um átomo de oxigênio, um átomo de enxofre ou uma ligação simples; e

R é H, alquilo C₁₋₆, arilo substituído ou não substituído, arilmetilo substituído ou não substituído ou cicloalquilo substituído ou não substituído, desde que no caso (i), quando AA é uma ligação simples e R é H, então n+n' não é igual a 1, 2, 3 ou 4

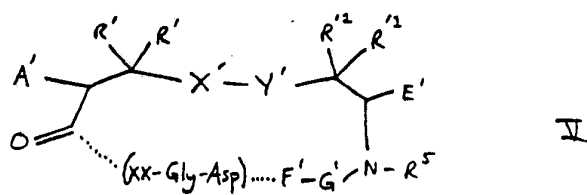
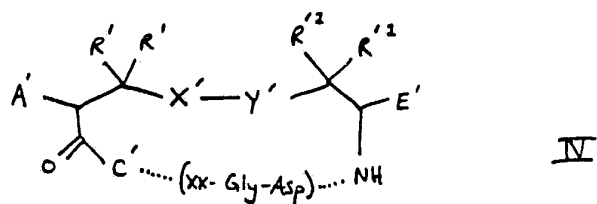
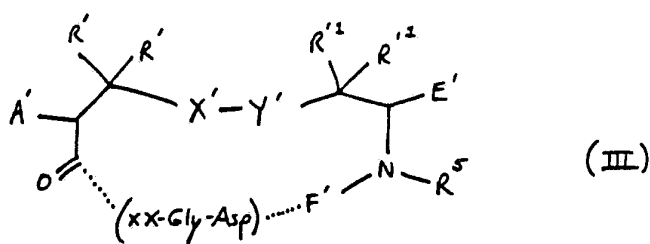
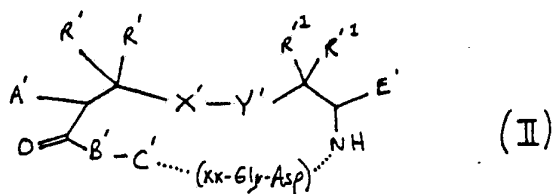
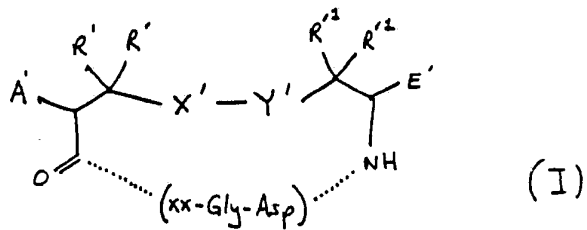
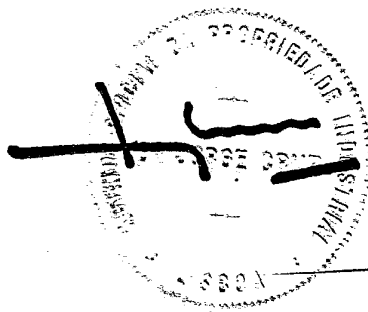
e

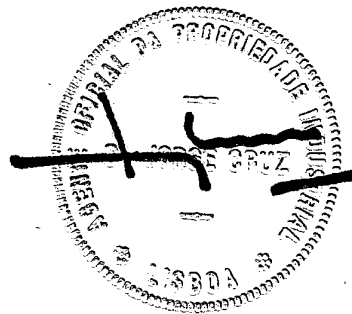
I' representa uma cadeia lateral de um L-aminoácido, E' é H, COOH, CONH₂, CONR², CONR³R⁴, CH₂OH, CO₂R², CH₃ em que R² é um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono ou NR³R⁴ é um aminoácido secundário ou



desde que quando B for zero aminoácidos substituídos ou não substituídos, então Q é H, NH₂ ou Ac-NH e quando B for um ou dois aminoácidos substituídos ou não substituídos, então Q é NH.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um composto em que ZZ é 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos de acordo com as fórmulas I, II, III, IV ou V:





em que

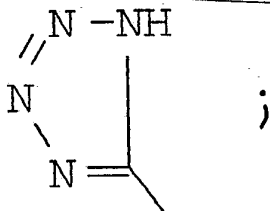
A' é H, acilamido, acilaminoacilamido, acilamino-N-metilaminoacil-amido;

R' e R¹ são independentemente H, metilo, etilo ou um grupo alquilo inferior tendo 1 a 5 carbonos;

X'-Y' é S-S, CH₂-S, S-CH₂, CH₂CH₂, CH₂, CH₂CH₂CH₂, CH₂-S-S, CH₂-S-S-CH₂; e

E' é H, COOH, CONH₂, CONR³R⁴, CH₂OH, CO₂R², CH³ em que R² é um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono, R³R⁴ é um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono ou NR³R⁴ é um aminoácido secundário,

ou



B' é um D- ou L- α -aminoácido;

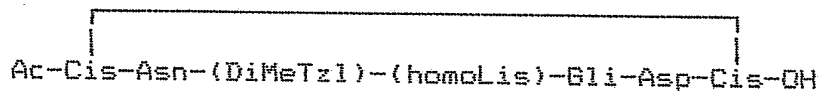
C' é D- ou L- α -aminoácido secundário ou um D- ou L- aminoácido primário;

F' é um L- α -aminoácido;

G' é um D- ou L- α -aminoácido, aminoácido cíclico secundário ou N-metil-aminoácido; e

R⁵ é H ou metilo.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um composto que é





6a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se preparar um composto que é

c(Aha-(homoLis)-Gli-Asp-Trp-Pro)

7a. - Processo para a preparação de uma composição para a inibição da agregação de plaquetas dependente do fibrinogénio num mamífero, caracterizado por se incluir na referida composição um composto de acordo com a reivindicação 1, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável, nomeadamente solução salina.

8a. - Método para a inibição da ligação do fibrinogénio a plaquetas de mamífero, caracterizado por compreender a administração de uma composição de acordo com a reivindicação 7 a um paciente, sendo a gama de dosagem de composto activo de 1 a 100 nM por quilograma por minuto.

9a. - Processo para a preparação de uma composição para a inibição da agregação de plaquetas dependente do fibrinogénio num mamífero, caracterizado por se incluir na referida composição um composto de acordo com a reivindicação 2, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável, nomeadamente solução salina.

10a.- Método para a inibição da ligação do fibrinogénio a plaquetas de mamífero, caracterizado por compreender a administração de uma composição de acordo com a reivindicação 9 a um paciente, sendo a gama de dosagem de composto activo de 1 a 100 nM por quilograma por minuto.

Lisboa, 12 de Outubro de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA