

---

Octroiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8301320**

Nederland

⑲ NL

---

- ⑤4 **Analogen van vasopressine.**
- ⑤1 Int.Cl.<sup>3</sup>: C07C 103/52, A61K 37/02.
- ⑦1 Aanvrager: Ceskoslovenská Akademie Ved te Praag.
- ⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.  
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU  
Joh. de Wittlaan 15  
2517 JR 's-Gravenhage.

- 
- ②1 Aanvraag Nr. 8301320.
- ②2 Ingediend 15 april 1983.
- ③2 Voorrang vanaf 20 april 1982, 19 november 1982.
- ③3 Land van voorrang: Tsjechoslowakije (CS).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 2803/82 , 8301/82 .
- ⑥2 --

- 
- ④3 Ter inzage gelegd 16 november 1983.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

Analogen van vasopressine

De uitvinding heeft betrekking op analogen van vasopressine. De desbetreffende analogen zijn gestabiliseerd tegen enzymatische splitsing, bevatten op de plaats 9 niet de glycine-amiderest en hebben belangrijke effecten op het centrale zenuwstelsel.

5 Het is bekend, dat neurohypofysiare hormonen en een aantal van de analogen ervan invloed hebben op het geheugen, de slaap en de leerprestaties van proefdieren (D. de Wied: Proc. Roy. Soc. B 210, 183 (1980)). Voor de praktische toepassing is het echter noodzakelijk, dat de ge-  
10 bruikte verbindingen enerzijds geen endocriene activiteiten van natuurlijke hormonen vertonen en dat ze anderzijds worden beschermd tegen enzymatische splitsing.

Gevonden werd nu, dat aan de bovengenoemde eisen wordt voldaan door de analogen volgens de uitvinding, die in vergelijking met het natuurlijke hormoon op de plaats 9 niet de glycine-amiderest bevatten en  
15 waarbij op de plaats 8 L-arginine is vervangen door de stereoisomere vorm of door de ornithinerest. In een van de desbetreffende verbindingen is de disulfidebinding vervangen door een thioetherbinding.

De uitvinding heeft betrekking op analogen van vasopressine met de formule van het formuleblad,  
20 waarin  $R^1$  H,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-S}$  en  $R^3$  D-Arg voorstellen, of  
waarin  $R^1$   $\text{NH}_2$ ,  $R^2$  S-S en  $R^3$  D-Arg voorstellen, of  
waarin  $R^1$   $\text{NH}_2$ ,  $R^2$  S-S en  $R^3$  L-Orn voorstellen,  
en waarin alle andere chirale aminozuren tot de L-reeks behoren.

In de formule van het formuleblad betekenen  
25 Tyr tyrosyl,  
Phe fenylalanyl,  
Gln glutaminyl,  
Asn asparaginyl,  
Pro prolyl,  
30 D-arg D-arginine en  
L-Orn L-ornithine.

De verbinding met de formule van het formuleblad, waarin  $R^1$  H,  $R^2$   $\text{CH}_2\text{-S}$  en  $R^3$  D-Arg voorstellen, wordt aangeduid als verbinding Ia; de verbinding met de formule van het formuleblad, waarin  $R^1$   
35  $\text{NH}_2$ ,  $R^2$  S-S en  $R^3$  D-Arg voorstellen, wordt aangeduid als verbinding Ib en de verbinding met de formule van het formuleblad, waarin  $R^1$   $\text{NH}_2$ ,  $R^2$  S-S en  $R^3$  L-Orn voorstellen, wordt aangeduid als verbinding Ic.

De bij de rat bepaalde endocriene biologische activiteiten (in I.U./mg - International Unit - zie "Handbook of Experimental Pharmacology", Deel XXIII: Neurohypophysial hormones and similar polypeptides (B. Berde, Ed), blz. 131, Springer-Verlag, Berlijn 1968) worden gegeven in de onderstaande tabel. De waarden van het natuurlijke hormoon arginine-vasopressine zijn ter vergelijking opgenomen.

## Tabel

## Biologische activiteiten

10	Verbindingen	Uterotonisch	Galactogogisch	Pressor	Antidiuretisch	
					a	b
	Ia	0,09	-	remming	0,8	0,2
	Ib	0,07	0,12	0,2	4,5	0,4
	Ic	0,09	0,02	0,2	0,3	0,1
15	AVP <sup>c</sup>	17	69	465	465	20

<sup>a</sup>verdoofde rat; <sup>b</sup>niet-verdoofde rest; de activiteit wordt uitgedrukt als percentage van het effect van [8-D-arginine] deamino-vasopressine bij het niveau van de drempelwaarde van de doelmatigheid;

20 <sup>c</sup>[8-arginine] - vasopressine.

De uterotonische, galactogogische en pressor-activiteiten bereiken waarden, die ten minste 3 orden van grootten lager zijn en de antidiuretische activiteit bereikt een waarde die ten minste 2 orden van grootten lager is dan de overeenkomstige activiteiten van het natuurlijke hormoon.

De bereide analogen werden toegepast bij de proef van de passieve afweerreactie, zogenaamde passieve vermijding, waarbij de gunstige effecten van natuurlijk vasopressine op geheugenprocessen werden aangetoond. Het principe van de proef berust op het feit, dat ratten de ruimte vermijden, waarin ze een matige elektrische schok in de poten krijgen. De lengte van de tijdsduur van deze vermijding wordt bepaald. Wanneer de toegediende verbinding deze reactie verlengt, kan het effect worden uitgelegd als een versterking van het met deze experimentele situatie in verband staande geheugenproces. De verbindingen werden ofwel onmiddellijk nadat de dieren de schok in de poten hadden gekregen ofwel 20 uren voor de proef van het behoud van de vermijdingsreactie in een dosis van 5  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  subcutaan toegediend. Het feit, dat het effect zelfs na 20 uren na de toediening wordt vertoond geeft het bewijs van een langdurig effect van de analogen, dat in dit opzicht hoog wordt gewaardeerd.

8301320

In de uitvoeringsvoorbeelden toegepaste analytische methoden:

De analyses van aminozuren werden uitgevoerd met een automatische inrichting (Development Workshops, Czechoslovak Academy of Sciences, type 6020). De peptidemonsters werden gedurende 20 uren gehydrolyseerd in 6 M HCl bij 105°C en 150 Pa. Dunne-laag-chromatografie werd uitgevoerd op silicagelplaten (handelsmerk Silifol-Kavalier) in de volgende systemen:

- S1 : 2-butanol - 98 % HCOOH - H<sub>2</sub>O (75 : 13,5 : 11,5)  
 S2 : 2-butanol - 25 % NH<sub>4</sub>OH - H<sub>2</sub>O (85 : 7,5 : 7,5)  
 10 S3 : 1-butanol - CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O (40 : 10 : 10)  
 S4 : 1-butanol - CH<sub>3</sub>COOH - pyridine - H<sub>2</sub>O (15 : 3 : 10 : 6)  
 S9 : benzeen met 20 % methanol  
 S13 : 1-butanol - CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O (50 : 15 : 40)  
 S23 : ethylacetaat - pyridine - CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O (5 : 5 : 1 : 3).

- 15 Elektroforetische analyse werd uitgevoerd op Whatman 3 MM papier in een vochtige kamer bij een potentiaal-gradiënt van 20 V/cm. De verbindingen werden aangetoond met ninhydrien of door middel van de chloreringsmethode.

De werkwijze voor het bereiden van de analogen volgens de uitvinding wordt in de onderstaande uitvoeringsvoorbeelden toegelicht.

Voorbeeld I - Bereiding van verbinding Ia

Bereiding van uitgangsverbindingen (tussenprodukten)

Bereiding van de benzylester van o-nitrobenzeensulfonylpropyl-N<sup>G</sup>-p-tolueensulfonyl-D-arginine.

- 25 Een oplossing van de 2,4,5-trichloorfenylester van o-nitrobenzeensulfonylproline (2,5 g) en het hydrobormide van de benzylester van N<sup>G</sup>-p-tolueensulfonyl-D-arginine (2,5 g) in dimethylformamide (5 ml) werd gedurende 40 uren bij laboratoriumtemperatuur geroerd. Het dimethylformamide werd onder verminderde druk verdampt, het residu werd opgelost in ethylacetaat en de ethylacetaatoplossing werd geëxtraheerd met een verzadigde oplossing van natriumwaterstofcarbonaat, water, een oplossing van KHSO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> met een pH van 2 en water. Na drogen op MgSO<sub>4</sub>, verdampen van ethylacetaat en kristallisatie uit ethylacetaat en petroleumether werden 3 g (90 %) van het produkt verkregen, dat smolt bij 90-92°C; [α]<sub>D</sub> -40,4° (c 0,4, methanol); R<sub>F</sub> 0,88 (S1), 0,75 (S2), 0,75 (S3), 0,83 (S4), 0,60 (S9). Voor

C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> (668,8) berekend: 55,67 % C, 5,43 % H, 12,56 % N, 9,59 % S; gevonden: 55,92 % C, 5,38 % H, 12,68 % N, 9,38 % S.

- Bereiding van de benzylester van het lactam van tyrosyl-fenyl-alanyl-glutaminy-asparaginy-S-(γ-carboxypropyl)cystefnyl-propyl-N<sup>G</sup>-p-to-

lueensulfonyl-D-arginine.

Een 2,6 M oplossing van waterstofchloride in ether (1 ml) werd toegevoegd aan een oplossing van de bovenbeschreven beschermde benzyl-ester (177 mg) in dimethylformamide (1 ml) en men liet het reactiemengsel gedurende 4 minuten bij laboratoriumtemperatuur staan. Het gevormde hydrochloride werd neergeslagen met ether en gedroogd;

( $E_{2,6}^{\text{Gly}} = 0,96$ ,  $E_{5,7}^{\text{His}} = 0,70$ ).

N-ethylpiperidine werd op zodanige wijze toegevoegd aan een oplossing van het hydrochloride in dimethylformamide (1 ml) dat de pH ongeveer 10 was en een oplossing van l-deamino-l-carbapressinezuur Brtník F., Barth T., Jošt K.: Collect. Czechoslovak Chem. Commun. 46, 278 (1981)) (100 mg) en N-hydroxybenzotriazool (23 mg) in dimethylformamide (1,5 ml) werd erop gegoten. Het reactiemengsel werd gekoeld tot  $-30^{\circ}\text{C}$ , dicyclohexylcarbodiimide (31 mg) in dimethylformamide (0,5 ml) werd toegevoegd en het mengsel werd gedurende 4 uren bij  $-5^{\circ}\text{C}$  en gedurende 20 uren bij omgevingstemperatuur geroerd. Dicyclohexylureum werd afgefiltreerd, dimethylformamide werd verdampt en het residu werd gewreven met chloorwaterstofzuur (pH 2) en op het filter gewassen met water, verzadigde natriumwaterstofcarbonaatoplossing, water en ether. Het ruwe produkt werd verkregen in een hoeveelheid van 160 mg en gezuiverd door gel-filtratie in dimethylformamide. De aflopende vloeistoffen, die de zuivere verbinding bevatten, werden ingedampt en het residu werd uit dimethylformamide en water gekristalliseerd. Het produkt met een smeltpunt van  $152-154^{\circ}\text{C}$  werd verkregen in een opbrengst van 100 mg. (60 %);  $[\alpha]_{\text{D}} - 34,0^{\circ}$  (c 0,45, dimethylformamide);  $R_{\text{F}}$  0,50 (S1), 0,54 (S3), 0,66 (S4). Analyse van aminozuren: Pro 0,98, Arg 0,97, Cys( $\text{C}_3\text{H}_6\text{CO}_2\text{H}$ ) 0,94, Gln 1,05, Asp 1,04, Tyr 0,92, Phe 1,08. Voor  $\text{C}_{59}\text{H}_{74}\text{N}_{12}\text{O}_{14}\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1257) berekend: 56,36% C, 6,09 % H, 13,37 % N, 5,10 % S; gevonden: 56,52 % C, 6,13 % H, 13,27 % N, 5,09 % S.

Bereiding van het eindprodukt:

Lactam van tyrosyl-fenylalanyl-glutaminy-asparaginy-S-( $\gamma$ -carboxypropyl)cystefnyl-propyl-D-arginine.

Een oplossing van de bovenbeschreven verbinding (30 mg) in tri-  
fluorazijnzuur (300  $\mu\text{l}$ ) werd gekoeld op  $0^{\circ}\text{C}$ , trifluormethaansulfonzuur (200  $\mu\text{l}$ ) en anisool (20  $\mu\text{l}$ ) werden toegevoegd en het mengsel werd bij dezelfde temperatuur gedurende 30 minuten apart gezet. Het mengsel werd geprecipiteerd met ether en gefiltreerd door een kolom met een anionen-  
uitwisselaar in de acetaatvorm. De uitlopende vloeistoffen werden ge-  
vriesdroogd en het gelyofiliseerde materiaal werd gezuiverd door vrije-

8301320

stromingselektroforese (2500 V, 135 mA).

Het produkt met  $[\alpha]_D - 47^\circ$  (c 0,1, 1 M azijnzuur) werd verkregen in een hoeveelheid van 6 mg;  $R_F$  0,34 (S1), 0,57 (S4), 0,74 (S23);

$E_{2,4}^{Gly}$  0,80. Samenstelling van de aminozuren: Arg 1,01,

5 Pro 1,04, Gln 1,01, Asp 1,02, Phe 0,97, Tyr 0,94, Cys( $C_3H_6CO_2H$ )

0,98. Voor  $C_{45}H_{62}N_{12}O_{12}S \cdot CH_3COOH \cdot 3H_2O$  (1109)

berekend: 50,89 % C, 6,54 % H, 15,15 % N; gevonden: 50,68 % C,

6,45 % H, 14,92 % N.

Voorbeeld II - Bereiding van verbinding Ic

10 Bereiding van uitgangsverbindingen

Benzylester van N-benzyloxycarbonyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)-cysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)cysteinyl-prolyl- $N^\delta$ -benzyloxycarbonalornithine.

15 Een 3 M oplossing van waterstofchloride in dioxaan (130  $\mu$ l) werd onder roeren toegevoegd aan een oplossing van het hydrazide van N-benzyloxycarbonyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)cysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)-cysteïne (Brtník F., Barth T., Krejčí I., Jošt K.: Collection Czechoslovak Chemical Communications; in druk) (238 mg) in dimethylformamide (2 ml).

20 De oplossing werd gekoeld tot  $-20^\circ C$  en er werd butylnitriet (21 mg) in dimethylformamide (0,5 ml) toegevoegd. Het reactiemengsel werd gedurende 20 minuten geroerd, gekoeld tot  $-40^\circ C$ , geneutraliseerd met N-ethylpiperidine (pH 7 op een vochtig pH-indicatorpapier) en een op de volgende wijze bereide oplossing werd toegevoegd:

25 Benzylester van o-nitrobenzeensulfenylprolyl- $N^\delta$ -benzyloxycarbonylornithine (Brtník F., Barth T., Krejčí I., Jošt K.: Collection Czechoslovak Chemical Communications; in druk) (182 mg) werd opgelost in dimethylformamide (1 ml) en 3 M HCl in ether (0,5 ml) werd aan deze oplossing toegevoegd. Na 5 minuten werd het reactiemengsel verdund met  
30 ether en werd het afgescheiden neerslag gedecanteerd en gewassen met ether. Het verkregen hydrochloride werd opgelost in dimethylformamide (2 ml), de oplossing werd met N-ethylpiperidine ingesteld op pH 10 en deze oplossing werd toegevoegd aan het azide, waarvan de bereiding in het bovenstaande is beschreven. Na 60 uren bij  $0^\circ C$  werd het reactie-  
35 mengsel ingedampt en werd het residu achtereenvolgens gewreven met 0,5 M HCl, water, verzadigde  $NaHCO_3$  oplossing en opnieuw met water. Het produkt werd gezuiverd door kristallisatie uit een mengsel van dimethylformamide en water en door gel-filtratie in dimethylformamide. Het bij  $238-240^\circ C$  smeltende produkt werd verkregen in een opbrengst van 300  
40 mg (93 %),  $[\alpha]_D - 27,6^\circ$  (c 0,15, dimethylformamide);  $R_F$  0,86 (S1),

8301320

0,67 (S2), 0,82 (S3), 0,91 (S4). Voor

$C_{86}H_{103}N_{11}O_{16}S_2 \cdot 2H_2O$  (1617) berekend: 63,88 % C,  
6,67 % H, 9,53 % N, 3,97 % S; gevonden: 64,00 % C, 6,38 % H, 9,57 % N,  
3,95 % S.

5 Bereiding van het eindprodukt

[8-Ornithine, 9-desglycineamide]vasopressine

Het bovenbeschreven beschermde octapeptide (100 mg) werd opgelost in trifluorazijnzuur (1,25 ml), thioanisool (100  $\mu$ l) werd toegevoegd en de oplossing werd gekoeld tot 0°C. Op dezelfde temperatuur gekoeld tri-  
10 fluormethaansulfonzuur (1 ml) werd aan het reactiemengsel toegevoegd. Na 30 minuten bij 0°C werd het mengsel verdund met ether, het afgescheiden precipitaat werd gefiltreerd en opgelost in water (300 ml). De oplossing werd ingesteld op pH 6,8 met 0,1 M NaOH en het reactiemengsel werd gedurende 1 uur met luchtzuurstof geoxydeerd. Vervolgens werd de  
15 pH met azijnzuur ingesteld op 3,9 en werd de oplossing door een kolom met een zwak-basische ionenuitwisselaar in de acetaatvorm gefiltreerd. De uitlopende vloeistoffen werden gevriesdroogd (89 mg), het gelyofili-seerde materiaal werd opgelost in 50 % water bevattend azijnzuur en het produkt werd gezuiverd door gel-filtratie. Er werden 15,3 mg (24 %) van  
20 de verbinding verkregen met  $[\alpha]_D -15,1^\circ$  (c 0,2, 1 M azijnzuur);  
 $E_{2,4}^{Gly}$  0,89,  $E_{5,7}^{His}$  0,34;  $R_F$  0,37 (S4), 0,43 (S13), 0,89 (S23). Analyse van aminozuren: Phe 1,01, Tyr 0,92, Gln 1,00, Asp 1,00, Pro 1,03, Orn 0,99. De hoeveelheid cysteine werd na oxydatie met permierzuur in een afzonderlijk monster als cysteïnezuur  
25 bepaald: 1,92. Voor

$C_{43}H_{59}N_{11}O_{12}S_2 \cdot 2CH_3CO_2H \cdot 2H_2O$  (1142) berekend:  
49,42 % C, 6,26 % H, 13,48 % N; gevonden: 49,18 % C, 5,95 % H, 13,30 % N.

Voorbeeld III - Bereiding van verbinding Ib

30 Bereiding van de uitgangsverbinding

Benzylester van N-benzyloxycarbonyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)-cysteinyl-tyrosyl-fenylalanyl-glutaminyl-asparaginylnyl-S-(2,4,6-trimethylbenzyl)cysteinyl-prolyl<sup>G</sup>-p-tolueensulfonyl-D-arginine.

De oplossing van het azide van het beschermde hexapeptide werd op  
35 dezelfde wijze bereid als wordt beschreven in voorbeeld I.

De benzylester van o-nitrobenzeensulfonylprolyl-N<sup>G</sup>-p-tolueensulfonyl-D-arginine werd bereid volgens de TjechoSlovaakse octrooiaanvraag 2099-81. Er werd waterstofchloride (2 M oplossing) in ether (0,5 ml) aan de oplossing van deze verbinding (200 mg) in dimethylformamide  
40 (1 ml) toegevoegd. Men liet het reactiemengsel gedurende 5 minuten bij

omgevingstemperatuur staan en vervolgens werd het met ether verdund. Het precipiterende hydrochloride werd afgescheiden door afzuigen, gewassen met ether, opgelost in dimethylformamide (2 ml) en de pH van de oplossing werd ingesteld op 10 met N-ethylpiperidine. Deze oplossing  
 5 werd toegevoegd aan de oplossing van het azide en men liet het reactiemengsel gedurende 60 uren bij 0°C staan. Het dimethylformamide werd afgedampt en het residu werd opgewerkt en gezuiverd volgens de in voorbeeld I beschreven methode.

Het bij 230-232°C smeltende produkt werd verkregen in een op-  
 10 brengst van 310 mg (93 %);  $[\alpha]_D -28,6^\circ$  (c 0,5, dimethylformamide);  $R_F$  0,94 (S1), 0,75 (S2), 0,90 (S3), 0,96 (S4). Voor  $C_{86}H_{105}N_{13}O_{16}S_3 \cdot H_2O$  (1691) berekend: 61,08 % C, 6,26 % H, 10,77 % N, 5,69 % S; gevonden: 60,89 % C, 6,23 % H, 10,75 % H, 5,42 % S.

15 Bereiding van het eindprodukt

[8-D-Arginine, 9-desglycineamide]vasopressine.

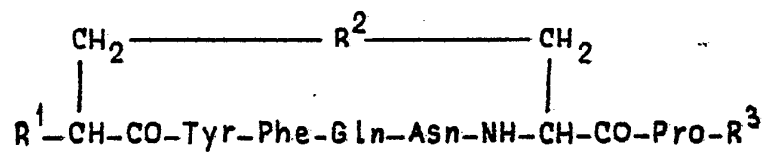
De beschermende groepen werden van het bovenbeschreven octapeptide (100 mg) afgesplitst en de oxydatie werd op dezelfde wijze als wordt beschreven in voorbeeld I uitgevoerd. Op soortgelijke wijze werd ook de  
 20 ontzouting en de gel-filtratie uitgevoerd. Het produkt werd verkregen in een opbrengst van 14 mg (23 %);  $[\alpha]_D - 17,7^\circ$  (c 0,27, 1 M azijnzuur);  $E_{2,4}^{Gly}$  0,56,  $E_{5,7}^{His}$  0,32;  $R_F$  0,34 (S4), 0,42 (S13), 0,91 (S23). Analyse van aminozuren: Phe 1,02, Tyr 0,91, Asp 1,02, Gln 1,04, Pro 1,02, Arg 1,00, Cys(O<sub>3</sub>H) 1,92 (de waar-  
 25 de voor cysteïnezuur werd verkregen met een afzonderlijk monster na oxydatie met permieerzuur). Voor  $C_{44}H_{61}N_{13}O_{12}S_2 \cdot 2CH_3COOH \cdot 2H_2O$  (1124) berekend: 49,14 % C, 6,19 % H, 16,20 % N; gevonden: 49,02 % C, 5,98 % H, 15,94 % N.

C O N C L U S I E S.

1. Analogen van vasopressine met de formule van het formuleblad,  
waarin  $R^1$  H,  $R^2$  CH<sub>2</sub>-S en  $R^3$  D-Arg voorstellen, of  
waarin  $R^1$  NH<sub>2</sub>,  $R^2$  S-S en  $R^3$  D-Arg voorstellen, of  
5 waarin  $R^1$  NH<sub>2</sub>,  $R^2$  S-S en  $R^3$  L-Orn voorstellen,  
en waarin alle andere chirale aminozuren tot de L-reeks behoren.

2. Farmaceutisch préparaat, gekenmerkt door een gehalte aan een  
analoog van vasopressine volgens conclusie 1.

+++++



830 1320