



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101982900000624
Data Deposito	23/11/1982
Data Pubblicazione	23/05/1984

Priorità	323.859
Nazione Priorità	US
Data Deposito Priorità	23-NOV-81

Titolo

Amminoacidi fosfinilalcanoici utili come agenti ipotensivi
--

DOCUMENTAZIONE RILEGATA

DESCRIZIONE del brevetto per invenzione industriale dal

titolo:

"Aminoacidi fosfinilalcanoici utili come agenti ipoten-
sivi"

di: E.R. SQUIBB & SONS, INC., nazionalità statunitense,
Lawrenceville-Princeton Road, New Jersey 08540, Stati
Uniti d'America.

Inventore designato: Edward W. Petrillo

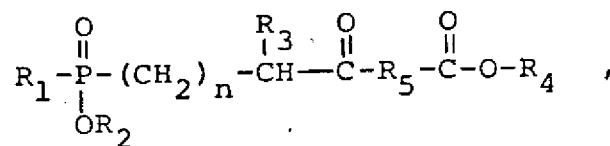
Depositata il: **23 NOV. 1982**

2 4 3 8 0 A / 82

*** ** * ** ***

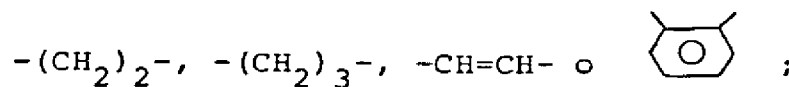
RIASSUNTO

L'attività dell'enzima che converte l'angiotensina
viene inibita da composti aventi la formula:



e dai suoi sali in cui R_1 è alchile, arile, arilalchile,
cicloalchile o cicloalchil(alchile);

R_2 e R_4 rappresentano ciascuno indipendentemente:
idrogeno, alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$, dove X è:
idrogeno, alchile o fenile e Y è: idrogeno, alchile, feni-
le o alcossi, oppure X ed Y sono congiuntamente:



R_3 è idrogeno o alchile;

$-\text{R}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ è un residuo di un aminoacido

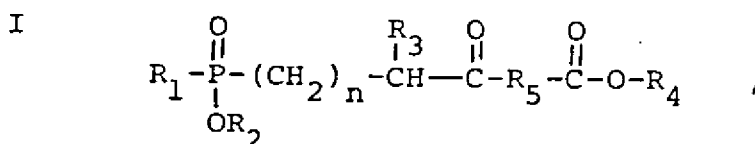
scelto nel gruppo consistente di glicina, alanina, valina, norvalina, leucina, N-metilleucina, norleucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, serina, treonina, cisteina, metionina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, lisina, asparagina, glutammina, istidina o triptofano; e

n è 0 oppure 1.

*** * * * *

DESCRIZIONE

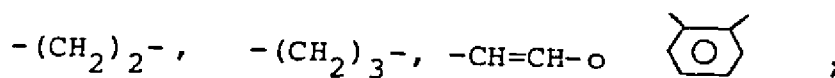
Composti aventi la formula (I)



e sali relativi, presentano attività ipotensiva. Nella formula I e nella descrizione che segue, i simboli sono come di seguito definiti.

R_1 è alchile, arile, arilachile, cicloalchile o cicloalchil(alchile);

R_2 e R_4 sono ciascuno indipendentemente idrogeno, alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$, dove X è idrogeno, alchile o fenile e Y è idrogeno, alchile, fenile o alcosi, oppure X ed Y presi congiuntamente sono



R_3 è idrogeno o alchile;

$$-R_5-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$$
 è un residuo di un amminoacido scelto nel gruppo consistente di glicina, alanina, valina, norvalina, leucina, N-metilleucina, norleucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, serina, treonina, cisteina, metionina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, lisina, asparagina, glutammina, istidina o triptofano; e

n è 0 oppure 1.

Il termine "arile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda il fenile o il fenile sostituito con gruppi alogeno, alchile, alcossi, alchiltio, idrossi, alcanoile, nitro, ammino, dialchilammino o trifluorometile.

Il fenile ed il fenile monosostituito sono preferiti ed il fenile è il maggiormente preferito.

Il termine "alchile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi aventi da 1 a 10 atomi di carbonio. Sono preferiti i gruppi alchile contenenti da 1 a 4 atomi di carbonio.

Il termine "cicloalchile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi aventi da 3 a 7 atomi di carbonio.

Il termine "alcossi", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi contenenti da 1 a 8 atomi di carbonio.

Sono preferiti i gruppi alcossi contenenti da 1 a 3 atomi di carbonio.

Il termine "alogeno", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda fluoro, cloro, bromo ed iodio. I gruppi alogeno preferiti sono fluoro e cloro.

Il termine "alcanoile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda i gruppi aventi da 2 a 9 atomi di carbonio.

I composti con formula I, ed i sali relativi, sono agenti ipotensivi. Essi inibiscono la conversione del decapeptide angiotensina I in angiotensina II e pertanto sono utili nel ridurre o nell'alleviare l'ipertensione collegata all'angiotensina. L'azione dell'enzima renina sull'angiotensinogeno, una pseudoglobulina nel plasma sanguigno, produce angiotensina I. L'angiotensina I viene convertita mediante l'enzima che converte l'angiotensina (ACE) in angiotensina II. Quest'ultima costituisce una sostanza attiva di pressione che è stata coinvolta quale agente causativo in varie forme di ipertensione in varie specie di mammiferi, ad esempio soggetti umani. I composti della presente invenzione intervengono nella sequenza $\text{angiotensina} \rightarrow (\text{renina}) \rightarrow \text{angiotensina I} \rightarrow (\text{ACE}) \rightarrow \text{angiotensina II}$ inibendo l'enzima che converte l'angiotensina e riducendo o eliminando la formazione della sostanza

di pressione angiotensina II. Così mediante somministrazione di una composizione contenente uno (o una combinazione) dei composti della presente invenzione, viene alleviata l'ipertensione dipendente da angiotensina nelle specie mammifere (ad esempio soggetti umani) che ne soffrono. Per ridurre la pressione sanguigna è adatta una dose singola, o preferibilmente da 2 a 4 dosi suddivise giornalmente, purchè sulla base da circa 0,1 a 100 mg per chilogrammo di peso corporeo e per giorno, preferibilmente da circa 1 a 15 mg per chilogrammo di peso corporeo e per giorno. La sostanza viene preferibilmente somministrata per via orale, ma possono anche essere utilizzate le somministrazioni per via parenterale, come sottocutanea, intramuscolare, intravenosa o intraperitoneale.

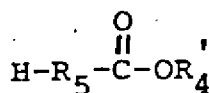
I composti della presente invenzione possono anche essere formulati in combinazione con un diuretico per il trattamento dell'ipertensione. Un prodotto di combinazione comprendente un composto della presente invenzione ed un diuretico, può essere somministrato in quantità efficace che comprende un dosaggio giornaliero totale da circa 30 a 600 mg, preferibilmente da circa 30 a 330 mg di un composto della presente invenzione e da circa 15 a 300 mg, preferibilmente da circa 15 a 200 mg del diuretico, ad una specie mammifera che ne abbia necessità. Esempi di diuretici utili per l'uso in combinazione con

un peptide della presente invenzione, sono diuretici triazi-
de, ad esempio clortiazide, idroclortiazide, flumetiazide,
idroflumetiazide, bendroflumetiazide meticlortiazide,
triclormetiazide, politiazide o benztiazide, come pure
acido etacrinico, ticrinafen, clortalidone, furosemide,
musolimina, bumetanide, triamterene, amiloride e spirono-
lattone, nonché i sali di tali composti.

I composti con formula I possono essere formulati
per l'uso nella riduzione della pressione sanguigna in
composizioni come compresse, capsule o sciroppi per la
somministrazione orale, oppure in forma di soluzioni o
sospensioni sterili per la somministrazione parenterale.
Da circa 10 a 500 mg di un composto con formula I vengono
posti in combinazione con un veicolo, supporto, eccipien-
te, legante, preservante, stabilizzante, aroma, ecc.,
fisiologicamente accettabili, secondo una forma di dosag-
gio unitario quale richiesta nella pratica farmaceutica
accettata. La quantità di sostanza attiva in queste compo-
sizioni o preparazioni è tale da ottenere un dosaggio
adatto nell'ambito sopra indicato.

I fosfinilalcanoil ammino acidi con formula I
possono essere preparati mediante reazione di un composto
avente la formula II

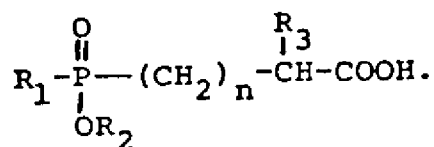
II



con acido fosfinil-acetico o propionico avente la formula

III

III

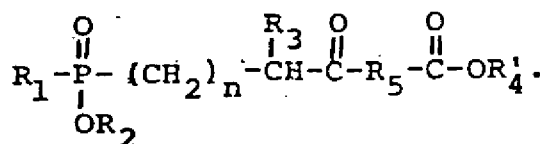


Nella formula II e nella descrizione, R'_4 è alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$. La reazione può essere condotta utilizzando procedure note di formazione del legame amide. Ad esempio la reazione può essere condotta in presenza di un agente di accoppiamento come dicicloesilcarbodiimide, oppure l'acido con formula III può essere attivato mediante formazione della sua anidride mista, dell'anidride simmetrica, dell'alogenuro dell'acido (preferibilmente cloruro dell'acido) o dell'estere acido, oppure mediante l'uso del reagente K di Woodward, N-etossicarbonil-2-etossi-1,2-diidrochinolina, N,N'-carbonildiimidazolo o simili. Una elencazione di questi metodi può essere trovata in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), volume XV, parte II, pagina 1 e seguenti (1974).

Il prodotto della reazione presenta la formula

IV

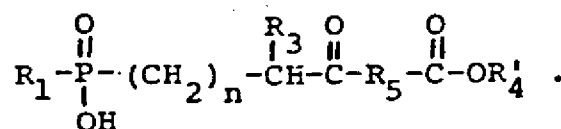
IV



I composti con formula I nei quali R_2 è idrogeno possono essere alternativamente ottenuti mediante (i) trattamento del composto corrispondente con formula IV in cui R è alchile con un alogenossilano come bromotrimetilsilano e con acqua, oppure (ii) idrogenazione catalitica del composto corrispondente con formula IV nel quale R_2 è arilalchile, ad esempio utilizzando carbone palladiato.

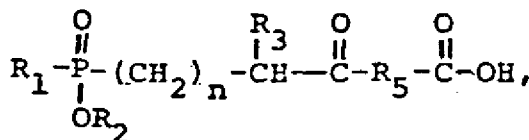
Questi prodotti presentano la formula V

V



I composti con formula I nei quali R_4 è idrogeno, cioè i composti aventi la formula VI

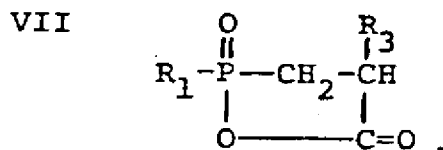
VI



possono essere ottenuti mediante idrolisi basica di un composto con formula IV o V. Alternativamente un composto con formula IV o V, in cui R'_4 è un gruppo estere facilmente allontanabile (come t-butile), può essere trattato con acido trifluoroacetico ed anisolo per ottenere l'acido carbossilico con formula I.

I fosfinilalcanoil ammino acidi con formula I nei quale n è 1, possono alternativamente essere preparati mediante reazione di un composto con formula II con

un fosfolano avente la formula VII



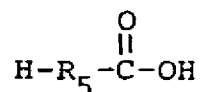
La reazione procede molto facilmente quando condotta in presenza di una base organica, ad esempio trietilammina, piridina, N,N-dimetilammina o simili, in un solvente organico inerte come acetonitrile, diclorometano, etere, tetraidrofurano o simili.

I derivati dell'acido fosfinil-acetico o propionico con formula III possono essere preparati utilizzando procedure note, si veda ad esempio il brevetto U.S. 4.168.267, rilasciato il 18 settembre 1979. I fosfolani con formula VII possono essere preparati seguendo la procedura descritta in Zh. Obsh. Kim., 37:411 (1967) ed in Zh. Obsh. Kim., 38:288 (1968).

Gli esteri dell'ammino acido con formula II sono noti oppure sono facilmente ottenibili utilizzando tecniche note di esterificazione che vengono illustrate negli esempi.

Procedimenti ulteriori per preparare i composti della presente invenzione diverranno evidenti all'esperto nel settore dall'invenzione stessa. Per esempio il gruppo carbossile dell'ammino acido avente la formula VIII

VIII



può essere protetto, ad esempio mediante conversione in sale amminico, oppure in estere 2-idrossietilico o difenilmetilico, può essere fatto reagire con un acido fosfinil-acetico o propionico con formula III e può quindi essere privato del gruppo protettivo per dare un prodotto con formula VI.

L'esterificazione di un prodotto con formula VI utilizzando procedure note nella tecnica, produce il corrispondente prodotto con formula IV.

Una procedura alternativa per preparare i composti della presente invenzione nei quali R_2 è alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{Y}$ e R_4 è idrogeno, comprende l'alchilazione iniziale del corrispondente composto con formula V in cui R'_4 è benzidrile o t-butile e quindi il sottoporre il composto corrispondente a scissione dell'estere con acido trifluoroacetico e anisolo o con altri reagenti noti nella tecnica.

I composti con formula I (nei quali $-\text{R}_5-\text{COO}$ è un residuo di un ammino acido diverso dalla glicina) esistono nelle forme diastereoisomere oppure in miscele racemiche; tutte rientrano nella portata della presente invenzione. Sono preferiti gli isomeri L.

I composti della presente invenzione in cui almeno uno tra R_2 e R_4 è idrogeno, formano sali basici con varie basi inorganiche ed organiche, che rientrano nell'ambito dell'invenzione. Tali sali comprendono sali di ammonio, sali di metallo alcalino come sali di litio, sodio e potassio (che sono i preferiti), sali di metalli alcalino terrosi come sali di calcio e di magnesio, sali con basi organiche, ad esempio sale con dicicloesilammina, benzzatina, N-metil-D-glucammina, sali di idrabammina, sali con amminoacidi come arginina, lisina e simili. Sono preferiti i sali non tossici e fisiologicamente accettabili, sebbene altri sali possono essere utili, ad esempio nell'isolamento o purificazione del prodotto. I sali vengono formati utilizzando tecniche convenzionali.

Quelli che seguono sono esempi di attuazioni specifiche della presente invenzione.

Esempio 1

Estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

1,1'-carbonildiimidazolo (0,56 g) fu aggiunto a porzioni ad una soluzione raffreddata (0°C) di acido [[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetico (0,98 g) in 70 ml di acetonitrile. Questa miscela di reazione fu agitata sotto argon a 0°C per 1,5 ore. Il sale HCl di L-tirosina metil estere (0,8 g) fu disciolto in metanolo e neutraliz-

zato con trietilammia (0,35 g). La soluzione fu concentrata sotto vuoto, disciolta in 10 ml di acetonitrile caldo ed aggiunta goccia a goccia alla soluzione sopra indicata dell'estere dell'acido fosfinico attivato nella catena laterale. La miscela di reazione fu agitata per una notte sotto argon e quindi concentrata sotto vuoto. Una soluzione del residuo di fondo in diclorometano fu lavata (H_2O , $NaHCO_3$ acquoso, soluzione salina), essiccata ($MgSO_4$) e filtrata per dare 1,4 g dell'estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

Esempio 2

Estere metilico di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

Trimetilsililbromuro (0,5 ml) fu aggiunto ad una soluzione raffreddata di estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina (1,4 g; si veda l'esempio 1) in 50 ml di diclorometano. Si agitò sotto argon per 2 giorni e si concentrò quindi sotto vuoto. Il residuo fu disciolto in 150 ml di acetato di etile, fu lavato (NaH_2PO_4 acquoso al 10%, soluzione salina) ed essiccato ($MgSO_4$). Il prodotto fu separato dal materiale di partenza mediante estrazione con soluzione di acetato di etile con tre porzioni di $NaHCO_3$ acquoso al 25%. La soluzione del bicarbonato fu acidificata con HCl acquoso al 10% ed estratta con due porzioni da 100 ml di acetato

di etile contenenti 5 ml di isopropanolo. Si essiccò quindi con MgSO_4 , si filtrò e si concentrò sotto vuoto per dare 0,94 g del prodotto analitico.

Calcolato per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}$:

C, 60,96; H, 6,51; N, 3,23; P, 7,15

per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$:

C, 59,72; H, 6,61; N, 3,17; P, 7,0

Trovato: C, 59,56; H, 6,27; N, 3,00; P, 6,7.

Esempio 3

N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

L'estere metilico di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina (0,86 g; si veda l'esempio 2) fu disciolta in 10 ml di metanolo. Fu aggiunto idrossido di sodio (0,24 g) in 7 ml di acqua e la soluzione fu agitata alla temperatura ambiente per 4 ore. Alla fine di questo periodo di tempo il pH era a pari a 10. Fu evaporato il metanolo e la miscela di reazione fu diluita con 20 ml di acqua, filtrata su filtro Millipore ed il filtrato fu acidificato con KHSO_4 al 10%.

La soluzione acquosa fu saturata con sale, estratta con acetato di etile, essiccata (MgSO_4), filtrata e concentrata sotto vuoto per dare 0,5 g di materiale analitico.

Calcolato per $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$:

C 60,28; H 6,02; N 3,35; P 7,4

per $C_{21}H_{26}NO_6 \cdot 0,25 H_2O$:

C 59,64; H 6,08; N 3,31; P 7,3

Trovato: C 59,44; H 6,13; N 3,05; P 7,1.

Esempio 4

N^2 /[etossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetil]-L-arginina

Ad una soluzione di 5 g di acido [etossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico in 132 ml di dimetilformammide (DMF) anidra, alla temperatura ambiente e sotto azoto, furono aggiunti 2,9 g di 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI). Dopo 1 ora alla temperatura ambiente, la miscela di reazione fu trattata con 3,1 g di L-arginina aggiunta come solido in una porzione unica. Dopo agitazione della miscela di reazione per una notte sotto azoto, la DMF fu allontanata sotto vuoto e la miscela greggia di reazione fu disciolta in acqua, acidificata a pH 2 con HCl concentrato ed estratta con etere. La lavorazione dello strato etero produsse 1,7 g dell'acido di partenza. Il prodotto desiderato fu isolato mediante applicazione dell'estratto acquoso acidificato ad una colonna a scambio ionico (AG50W-X2) (H^+) preparata in acqua. L'eluizione iniziale con acqua allontanò il materiale acidico. Quando il pH ritornò ad un valore prossimo a quello neutro, fu applicato un gradiente da acqua a tampone piridina-acido acetico 0,07 M pH 6,5. Le frazioni positive al Sakaguchi furono raggruppate e liofilizzate per ottenere 2,1 g del prodotto. Que-

sto materiale fu infine purificato su circa 500 ml di resina Sephadex LH-20 in acqua per ottenere 1,9 g del composto nel titolo, con punto di fusione 55-65°C; $\bar{d}_D$ trascurabile.

Calcolato per 1,4 H₂O:

C 51,58; H 7,75; N 12,03; P 6,65.

Trovato: C 51,49; H 7,30; N 11,95; P 6,70.

Esempio 5

N²-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina

Una soluzione di N²-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina (652 mg; si veda l'esempio 4) in 15 ml di 4N acido bromidrico/acido acetico, fu mantenuta alla temperatura ambiente in un pallone chiuso per una notte. La miscela di reazione fu quindi bonificata con un flusso di azoto e trattata ripetutamente con acqua e concentrata in un evaporatore rotante. La liofilizzazione produsse 1,04 g di prodotto greggio. La cromatografia su resina carbossimetil cellulosa leggermente acidica CM-52 (H⁺) produsse un materiale che presentava ancora 0,75 equivalenti di HBr come indicato dalla microanalisi. Il composto nel titolo fu ottenuto alla fine puro per passaggio attraverso una resina a scambio ionico (AG50W-X2 (H⁺)) eluita dapprima con acqua per allontanare HBr, quindi alla fine con piridina acquosa al 5% per dare un totale di 178 mg di prodotto solido e bianco dopo liofiliz-

zazione. Il prodotto era solvatato con 0,7 H₂O.

Esempio 6

Estere fenilmetilico di N-[2-feniletil](fenilmetossi)fo-
sfinil/acetil]-L-triptofano

Acido 1-(2-feniletil)(fenilmetossi)fosfinil1acetico (3,2 g) e 1,1'-carbonildiimidazolo (1,6 g) furono agitati in 50 ml di acetonitrile anidro in un bagno a ghiaccio per 1 ora. La base libera di L-triptofano benzil estere, derivata da 4,8 g del sale cloridrato (da etere/ NaHCO_3) fu aggiunta a poco aceto-nitrile. Dopo agitazione a 0°C per 1 ora, la miscela fu lasciata a riposo alla temperatura ambiente per una notte, ripresa in etere, lavata con NaHSO_4 al 5%, con soluzione salina, con NaHCO_3 a saturazione, con soluzione salina (2 volte), essiccata (Na_2SO_4) ed evaporata a secchezza per dare 5,7 g del prodotto. Questo materiale fu cromatografato a flash su gel di silice LP-1 (400 ml) eluito con acetato di etile e produsse 3,6 g di prodotto sotto forma di olio leggermente colorato.

Analisi: calcolato per $C_{35}H_{31}N_2O_5P$:

C 70,69; H 5,93; N 4,71; P 5,21.

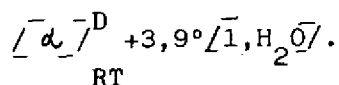
Trovato: C 70,55; H 5,98; N 4,65; P 5,28.

Esempio 7

Sale con ammoniaca di N-[[idrossi(2-feniletil)fosfinil]ace-
til]-L-triptofano

Estere fenilmetilico di N-2-(2-feniletil)(fenilme-

tossi)fosfinil/acetil/L-triptofano (3,3 g; si veda l'esempio 6) fu disciolto in metanolo e fu aggiunto idrossido di litio monoidrato (0,466 g) disciolto in poca acqua. La miscela fu agitata alla temperatura ambiente per 2 ore; fu aggiunto carbone palladiato al 10% (1 g) e la miscela fu idrogenata ad una atmosfera per 2 ore. Il catalizzatore fu filtrato attraverso Celite ed il filtrato fu evaporato a secchezza. Il residuo fu disciolto in acqua, fatto passare attraverso il filtro Millipore e liofilizzato per dare 2,1 g di prodotto, con punto di fusione superiore a 350°C,



Analisi: calcolato per $C_{21}H_{21}N_2O_5PLi_2 \cdot 3H_2O$:

C 52,51; H 5,67; N 5,83; P 6,45; Li 2,89.

Trovato: C 52,44; H 5,03; N 5,64; P 6,40; Li 3,1.

L'elettroforesi mostrava che questo materiale presentava due componenti. Esso (300 mg) fu cromatografato su DEAE sephadex (60 ml) (forma OH, pH 7,4), eluito con gradiente di NH_4HCO_3 (da 0,005 a 0,5 M). Le frazioni pure (contenenti un solo componente per elettroforesi) furono combinate ed evaporate. Il residuo fu disciolto in acqua, filtrato su Millipore e liofilizzato due volte per dare 0,29 g del prodotto, $[\alpha]_D^{RT} + 3^\circ / 0,5, H_2O$.

Analisi: calcolato per $C_{21}H_{23}N_2O_5P(NH_3) \cdot H_2O$:

C 56,12; H 6,28; N 9,35; P 6,87.

Seguendo la procedura degli esempi 4 e 5, ma partendo con il composto elencato in colonna I in luogo di L-arginina, si ottiene il composto elencato nella colonna II. Nell'esempio 21 risulta necessario utilizzare un derivato protetto della lisina.

18.

<u>Colonna I</u>	<u>Colonna II</u>
16. L-treonina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-treonina
17. L-cisteina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-cisteina
18. L-metionina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-metionina
19. acido L-aspartico	acido N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil) fosfinil]acetil]-L-aspartico
20. acido L-glutammico	acido N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil) fosfinil]acetil]-L-glutammico
21. ϵ -t-butossicar- bonil-L-lisina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-lisina
22. L-asparagina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-asparagina
23. L-glutammina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-glutammina
24. L-istidina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-istidina
25. L-norvalina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-norvalina
26. L-norleucina	N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi- nil]acetil]-L-norleucina.

Esempio 27

N-[[[(2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi](4-fenilbutil)fo-

sfinil/acetil/-L-fenilalaninaA) Estere fenilmetilico dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico

Ad una soluzione di cloroformiato di benzile (1,8 ml, 12,6 mmoli) in 5 ml di tetraidrofurano anidro fu aggiunta goccia a goccia una soluzione dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico (2,55 g, 10 mmoli) e trietilammina (2,0 ml, 14,5 mmoli) in 30 ml di tetraidrofurano anidro a 0°C. Dopo completamento dell'aggiunta, la miscela fu agitata a 0°C per 30 minuti ed alla temperatura ambiente per 1 ora. La miscela fu posta tra acetato di etile e KHSO_4 al 5% e lo strato di acetato di etile fu evaporato fino ad ottenere un residuo. Il residuo fu ripreso con NaHCO_3 acquoso, lavato con acetato di etile e la soluzione acquosa fu acidificata a pH 1 ed estratta con acetato di etile. Gli estratti furono anidrificati (Na_2SO_4) ed evaporati per dare un prodotto greggio che fu triturato con pentano per dare un solido con punto di fusione 64-67°C (3,30 g).

B) Estere fenilmetilico dell'acido //(2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi/7(4-fenilbutil)fosfinil/acetico

L'estere fenilmetilico dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico (3,30 g, 9,5 mmoli) fu ripreso in 10 ml di dimetilformammide anidra e trattato con trietilammina (2,7 ml, 9,5 mmoli) e con clorometil pivalato

(2,8 ml, 19,4 mmoli) e si agitò alla temperatura ambiente sotto argon per 16 ore. La miscela fu diluita con acetato di etile e lavata con acqua, con KHSO_4 al 5% e con NaHCO_3 a saturazione, quindi fu essiccata (Na_2SO_4) ed evaporata fino ad un residuo che fu purificato mediante cromatografia per flash su gel di silice utilizzando l'eluente etil acetato-esano per dare il diestere nel titolo (3,65 g, 83%) sotto forma di olio incoloro. TLC R_F (acetato di etile/esano, 1:1) = 0,39.

C) Acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$

L'estere fenilmetilico dell'acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$ (2,95 g, 6,4 mmoli) in 75 ml di acetato di etile fu idrogenato a 48 psi su catalizzatore carbone palladiato al 10% (0,4 g) per 1 ora. La miscela fu filtrata attraverso Celite ed evaporata a secchezza per dare l'acido nel titolo sotto forma di olio incoloro che solidificava in un solido con punto di fusione 48-50°C.

D) Estere N-idrossisuccinimmidico dell'acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metil}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$

Acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$ (2,22 g, 6 mmoli), N-idrossisuccinimide (0,69 g, 6 mmoli) e dicicloesilcarbodiimide

(1,24 g, 6 mmoli) furono disciolti in tetraidrofurano anidro a 0°C. La miscela fu agitata per una notte alla temperatura ambiente, filtrata ed il filtrato fu concentrato sotto vuoto fino a dare un residuo oleoso che fu triturato con etere diisopropilico, dando un solido con punto di fusione 102-105°C (2,1 g).

E) N-[[[(2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-fenilalanina

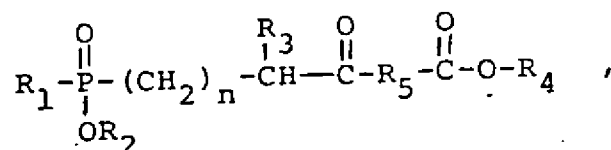
L-fenilalanina (1,65 g, 10 mmoli), trietilammina (2,8 ml) 20 mmoli) ed estere N-idrossisuccinimmidico dell'acido [[[(2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi](4-fenilbutil)fosfinil]acetico (4,67 g, 10 mmoli) vengono disciolti in 50 ml di dimetilformammide anidra e si agita per una notte sotto argon alla temperatura ambiente. La miscela di reazione viene suddivisa tra diclorometano e KHSO_4 al 5% e lo strato organico viene lavato con acqua e con soluzione salina e quindi essiccato ed evaporato per dare il prodotto desiderato.

Esempio 28-34

Seguendo la procedura dell'esempio 27, ma sostituendo il composto nella colonna I in luogo dell'acido [[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetico, il composto nella colonna II in luogo del clorometil pivalato ed il composto nella colonna III in luogo di L-fenilalanina, si ottiene il composto elencato nella colonna IV.

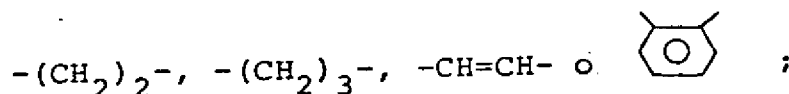
<u>Colonna I</u>	<u>Colonna II</u>		<u>Colonna III</u>
28. Acido <u>idrossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetico</u>	clorometil pivalato	L-alanina	N- <u>(((2,2-dimetil)-ossopropossi)metossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetil</u> -L-alanina
29. Acido <u>idrossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetico</u>	estere 1-cloroetilico dell' <u>acido acetico</u>	L-fenilalanina	N- <u>(((1-(acetilossi)etossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetil</u> -L-fenilalanina
30. Acido <u>idrossi</u> (2-feniletile)fosfinil <u>acetico</u>	estere clorometilico dell' <u>acido isobutirrico</u>	L-triptofano	N- <u>(((2-metil-1-ossopropossi)metossi</u> -4-fenilbutil)fosfinil <u>acetil</u> -L-triptofano
31. Acido <u>idrossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetico</u>	diestere etilclorometilico dell' <u>acido carbonico</u>	L-fenilalanina	N- <u>(((etossicarbonilossi)metossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>acetil</u> -L-fenilalanina
32. Acido <u>idrossi</u> (ottile)fosfinil <u>acetico</u>	estere 1-cloroetilico dell' <u>acido propionico</u>	L-tirosina	N- <u>(((ottile(1-(1-ossopropossi)etossi</u> fosfinil <u>acetil</u> -L-tirosina
33. Acido <u>esil</u> (idrossi)fosfinil <u>acetico</u>	1-cloroetil pivalato	L-metionina	N- <u>(((1-(2,2-dimetil-1-ossopropossi)etossi</u> (esil)fosfinil <u>acetil</u> -L-metionina
34. Acido <u>idrossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>- α - metilpropionico</u>	1-cloroetil pivalato	L-arginina	N- <u>(((2-metil-1-osso-(((1-(1-ossopropossi)etossi</u> (4-fenilbutil)fosfinil <u>propil</u> -L-arginina.

1. Composto avente la formula



o sale relativo, in cui R_1 è alchile, arile, arilalchile, cicloalchile o cicloalchil (alchile);

R_2 e R_4 sono ciascuno indipendentemente idrogeno, alchile, arilalchile o $-\underset{\substack{| \\ X}}{CH} - O - \overset{O}{\parallel}C - Y$, dove X è idrogeno, alchile o fenile e Y è idrogeno, alchile, fenile o alcoli, oppure X e Y sono assieme



R_3 è idrogeno o alchile;

$-R_5 - \overset{O}{\parallel}C - O -$ è un residuo di un ammino acido scelto nel gruppo consistente di glicina, alanina, valina, norvalina, leucina, N-metilleucina, norleucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, serina, treonina, cisteina, metionina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, lisina, asparagina, glutammina, istidina, o triptofano; e

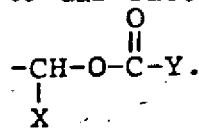
n è 0 oppure 1.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che n è 1.

3. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizza-

to dal fatto che R_2 e R_4 sono entrambi idrogeno.

4. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizza-
to dal fatto che uno tra R_2 e R_4 è idrogeno e l'altro è



5. Composto secondo la rivendicazione 1, estere metili-
co di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

6. Composto secondo la rivendicazione 1, estere metili-
co di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

7. Composto secondo la rivendicazione 1, N-[[idrossi
(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

8. Composto secondo la rivendicazione 1, N^2 -[[etossi
(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina.

9. Composto secondo la rivendicazione 1, N^2 -[[idrossi
(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina.

10. Composto secondo la rivendicazione 1, estere fenil-
metilico di N-[[[(2-feniletil)(fenilmetossi)fosfinil]ace-
til]-L-triptofano.

11. Composto secondo la rivendicazione 1, sale di
ammoniacale di N-[[idrossi(2-feniletil)fosfinil]acetil]-L-
-triptofano.

JACOBACCI - CASSETTA & PERANI
S.p.A.



l'Official Rogante
(Pietro Adinolfi)

Traduzione

24380A/82

Numero di serie: 323.859

Data di deposito: 23 novembre 1981

Classe: 260

Gruppo: 122

Richiedente: Edward W. Petrillo Jr., Pennington, NJ.

Dati continuativi: verificati

Domande estere/PCT: verificate

Stato: NJ

Tavole disegni: 0

Totale rivendicazioni: 11

Rivendicazioni indipendenti: 1

Tasse di deposito ricevute: \$ 67

Numero riferimento dell'agente: HA267

Indirizzo: Lawrence S. Levinson

E. R. SQUIBB-SONS, INC.

P.O. BOX 4000

Princeton, NJ 08540.

Titolo: FOSFINILALCANOIL AMMINO ACIDI

Si certifica con la presente che l'allegato è una copia conforme dagli archivi dell'Ufficio Brevetti e Marchi degli Stati Uniti di una domanda così come originariamente depositata e qui sopra identificata.

Per incarico del Commissario dei brevetti e marchi

A. L. Jackson

Funzionario addetto alle legalizzazioni.

Data: 24 settembre 1982

323.859

FOSFINILALCANOIL AMMINO ACIDI

Domanda collegata

La domanda di brevetto negli Stati Uniti 212.911, depositata il 4 dicembre 1980, descrive che le proline fosfinilalcanoil sostituite e gli esteri delle proline fosfinilalcanoil sostituite costituiscono inibitori dell'enzima che converte l'angiotensina e sono utili nel trattamento dell'ipertensione.

Basi dell'invenzione

La recente letteratura descrive una varietà di mercaptoacil ammino acidi che sono utili per inibire la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II nei mammiferi e costituiscono pertanto prodotti utili nel trattamento dell'ipertensione. Anche le fosfinilalcanoil proline vengono descritte in relazione alla stessa utilità.

Il brevetto Stati Uniti 4.105.776, rilasciato l'8 agosto 1978, descrive mercaptoacil ammino acidi, in cui l'ammino acido è, fra l'altro, prolina, 4-idrossiprolina e 4-alchilprolina.

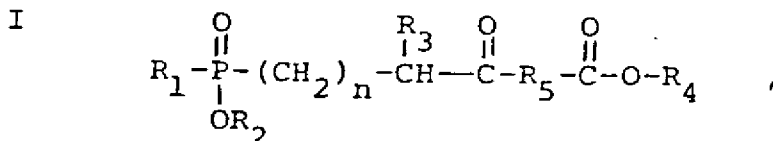
Il brevetto Stati Uniti 4.112.119, descrive mercaptoacil ammino acidi, in cui l'ammino acido è, tra l'al-

tro, alanina, leucina, fenilalanina, arginina, sarcosina, serina, asparagina, lisina, istidina, glicina, triptofano, cisteina, metionina, valina, glutammina o tirosina.

Il brevetto Stati Uniti 4.168.267, rilasciato il 18 settembre 1979, descrive fosfinilalcanoil proline, nonchè esteri e sali relativi.

Breve descrizione dell'invenzione

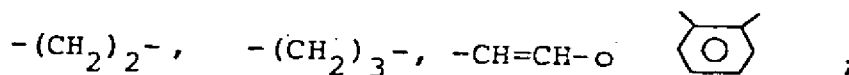
Composti aventi la formula (I)



e sali relativi, presentano attività ipotensiva. Nella formula I e nella descrizione che segue, i simboli sono come di seguito definiti.

R_1 è alchile, arile, arilachile, cicloalchile o cicloalchil(alchile);

R_2 e R_4 sono ciascuno indipendentemente idrogeno, alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Y}$, dove X è idrogeno, alchile o fenile e Y è idrogeno, alchile, fenile o alcosi, oppure X ed Y presi congiuntamente sono



R_3 è idrogeno o alchile;

$$-R_5-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$$
 è un residuo di un amminoacido scelto

nel gruppo consistente di glicina, alanina, valina, norvalina, leucina, N-metilleucina, norleucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, serina, treonina, cisteina, metionina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, lisina, asparagina, glutammina, istidina o triptofano; e

n è 0 oppure 1.

Il termine "arile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda il fenile o il fenile sostituito con gruppi alogenati, alchile, alcossi, alchiltio, idrossi, alcanoile, nitrato, ammino, dialchilammino o trifluorometile.

Il fenile ed il fenile monosostituito sono preferiti ed il fenile è il maggiormente preferito.

Il termine "alchile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi aventi da 1 a 10 atomi di carbonio. Sono preferiti i gruppi alchile contenenti da 1 a 4 atomi di carbonio.

Il termine "cicloalchile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi aventi da 3 a 7 atomi di carbonio.

Il termine "alcossi", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda gruppi contenenti da 1 a 8 atomi di carbonio.

Sono preferiti i gruppi alcossi contenenti da 1 a 3 atomi di carbonio.

Il termine "alogeno", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda fluoro, cloro, bromo ed iodio. I gruppi alogeno preferiti sono fluoro e cloro.

Il termine "alcanoile", come utilizzato nella descrizione sia da solo che come parte di un gruppo maggiore, riguarda i gruppi aventi da 2 a 9 atomi di carbonio.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I composti con formula I, ed i sali relativi, sono agenti ipotensivi. Essi inibiscono la conversione del decapeptide angiotensina I in angiotensina II e pertanto sono utili nel ridurre o nell'alleviare l'ipertensione collegata all'angiotensina. L'azione dell'enzima renina sull'angiotensinogeno, una pseudoglobulina nel plasma sanguigno, produce angiotensina I. L'angiotensina I viene convertita mediante l'enzima che converte l'angiotensina (ACE) in angiotensina II. Quest'ultima costituisce una sostanza attiva di pressione che è stata coinvolta quale agente causativo in varie forme di ipertensione in varie specie di mammiferi, ad esempio soggetti umani. I composti della presente invenzione intervengono nella sequenza angiotensina $\rightarrow$ (renina) $\rightarrow$ angiotensina I $\rightarrow$ (ACE) $\rightarrow$ angiotensina II inibendo l'enzima che converte l'angiotensina e riducendo o eliminando la formazione della sostanza

di pressione angiotensina II. Così mediante somministrazione di una composizione contenente uno (o una combinazione) dei composti della presente invenzione, viene alleviata l'ipertensione dipendente da angiotensina nelle specie mammifere (ad esempio soggetti umani) che ne soffrono. Per ridurre la pressione sanguigna è adatta una dose singola, o preferibilmente da 2 a 4 dosi suddivise giornalmente, purchè sulla base da circa 0,1 a 100 mg per chilogrammo di peso corporeo e per giorno, preferibilmente da circa 1 a 15 mg per chilogrammo di peso corporeo e per giorno. La sostanza viene preferibilmente somministrata per via orale, ma possono anche essere utilizzate le somministrazioni per via parenterale, come sottocutanea, intramuscolare, intravenosa o intraperitoneale.

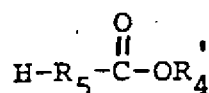
I composti della presente invenzione possono anche essere formulati in combinazione con un diuretico per il trattamento dell'ipertensione. Un prodotto di combinazione comprendente un composto della presente invenzione ed un diuretico, può essere somministrato in quantità efficace che comprende un dosaggio giornaliero totale da circa 30 a 600 mg, preferibilmente da circa 30 a 330 mg di un composto della presente invenzione e da circa 15 a 300 mg, preferibilmente da circa 15 a 200 mg del diuretico, ad una specie mammifera che ne abbia necessità. Esempi di diuretici utili per l'uso in combinazione con

un peptide della presente invenzione, sono diuretici triazi-
de, ad esempio clortiazide, idroclortiazide, flumetiazide,
idroflumetiazide, bendroflumetiazide meticlortiazide,
triclormetiazide, politiazide o benztiazide, come pure
acido etacrinico, ticrinafen, clortalidone, furosemide,
musolimina, bumetanide, triamterene, amiloride e spirono-
lattone, nonchè i sali di tali composti. ' .

I composti con formula I possono essere formulati
per l'uso nella riduzione della pressione sanguigna in
composizioni come compresse, capsule o sciroppi per la
somministrazione orale, oppure in forma di soluzioni o
sospensioni sterili per la somministrazione parenterale.
Da circa 10 a 500 mg di un composto con formula I vengono
posti in combinazione con un veicolo, supporto, eccipien-
te, legante, preservante, stabilizzante, aroma, ecc.,
fisiologicamente accettabili, secondo una forma di dosag-
gio unitario quale richiesta nella pratica farmaceutica
accettata. La quantità di sostanza attiva in queste compo-
sizioni o preparazioni è tale da ottenere un dosaggio
adatto nell'ambito sopra indicato.

I fosfinilalcanoil ammino acidi con formula I
possono essere preparati mediante reazione di un composto
avente la formula II

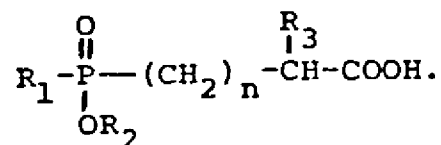
II



con acido fosfinil-acetico o propionico avente la formula

III

III

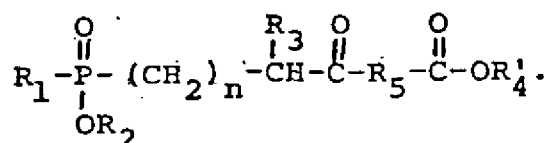


Nella formula II e nella descrizione, R'_4 è alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$. La reazione può essere condotta utilizzando procedure note di formazione del legame amide. Ad esempio la reazione può essere condotta in presenza di un agente di accoppiamento come dicicloesilcarbodiimide, oppure l'acido con formula III può essere attivato mediante formazione della sua anidride mista, dell'anidride simmetrica, dell'alogenuro dell'acido (preferibilmente cloruro dell'acido) o dell'estere acido, oppure mediante l'uso del reagente K di Woodward, N-etossicarbonil-2-etossi-1,2-diidrochinolina, N,N'-carbonildiimidazolo o simili. Una elencazione di questi metodi può essere trovata in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), volume XV, parte II, pagina 1 e seguenti (1974).

Il prodotto della reazione presenta la formula

IV

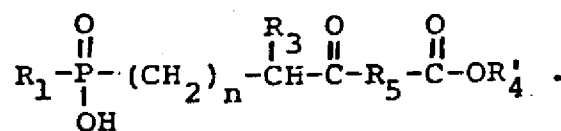
IV



I composti con formula I nei quali R_2 è idrogeno possono essere alternativamente ottenuti mediante (i) trattamento del composto corrispondente con formula IV in cui R è alchile con un alogenossilano come bromotrimetilsilano e con acqua, oppure (ii) idrogenazione catalitica del composto corrispondente con formula IV nel quale R_2 è arilalchile, ad esempio utilizzando carbone palladiato.

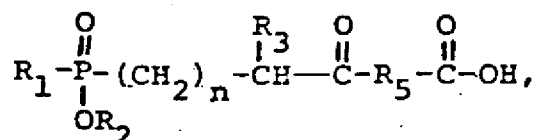
Questi prodotti presentano la formula V

V



I composti con formula I nei quali R_4 è idrogeno, cioè i composti aventi la formula VI

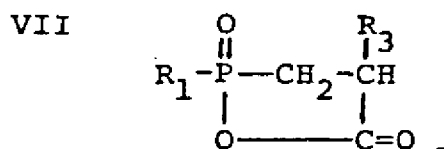
VI



possono essere ottenuti mediante idrolisi basica di un composto con formula IV o V. Alternativamente un composto con formula IV o V, in cui R'_4 è un gruppo estere facilmente allontanabile (come t-butile), può essere trattato con acido trifluoroacetico ed anisolo per ottenere l'acido carbossilico con formula I.

I fosfinilalcanoil ammino acidi con formula I nei quale n è 1, possono alternativamente essere preparati mediante reazione di un composto con formula II con

un fosfolano avente la formula VII

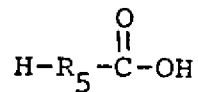


La reazione procede molto facilmente quando condotta in presenza di una base organica, ad esempio trietilammina, piridina, N,N-dimetilammina o simili, in un solvente organico inerte come acetonitrile, diclorometano, etere, tetraidrofurano o simili.

I derivati dell'acido fosfinil-acetico o propionico con formula III possono essere preparati utilizzando procedure note, si veda ad esempio il brevetto U.S. 4.168.267, rilasciato il 18 settembre 1979. I fosfolani con formula VII possono essere preparati seguendo la procedura descritta in Zh. Obsh. Kim., 37:411 (1967) ed in Zh. Obsh. Kim., 38:288 (1968).

Gli esteri dell'ammino acido con formula II sono noti oppure sono facilmente ottenibili utilizzando tecniche note di esterificazione che vengono illustrate negli esempi.

Procedimenti ulteriori per preparare i composti della presente invenzione diverranno evidenti all'esperto nel settore dall'invenzione stessa. Per esempio il gruppo carbossile dell'ammino acido avente la formula VIII



può essere protetto, ad esempio mediante conversione in sale amminico, oppure in estere 2-idrossietilico o difenilmetilico, può essere fatto reagire con un acido fosfinil-acetico o propionico con formula III e può quindi essere privato del gruppo protettivo per dare un prodotto con formula VI.

L'esterificazione di un prodotto con formula VI utilizzando procedure note nella tecnica, produce il corrispondente prodotto con formula IV.

Una procedura alternativa per preparare i composti della presente invenzione nei quali R_2 è alchile, arilalchile o $-\underset{\text{X}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{Y}$ e R_4 è idrogeno, comprende l'alchilazione iniziale del corrispondente composto con formula V in cui R'_4 è benzidrilico o *t*-butile e quindi il sottoporre il composto corrispondente a scissione dell'estere con acido trifluoroacetico e anisolo o con altri reagenti noti nella tecnica.

I composti con formula I (nei quali $-\text{R}_5-\text{COO}$ è un residuo di un ammino acido diverso dalla glicina) esistono nelle forme diastereoisomere oppure in miscele racemiche; tutte rientrano nella portata della presente invenzione. Sono preferiti gli isomeri L.

I composti della presente invenzione in cui almeno uno tra R_2 e R_4 è idrogeno, formano sali basici con varie basi inorganiche ed organiche, che rientrano nell'ambito dell'invenzione. Tali sali comprendono sali di ammonio, sali di metallo alcalino come sali di litio, sodio e potassio (che sono i preferiti), sali di metalli alcalino terrosi come sali di calcio e di magnesio, sali con basi organiche, ad esempio sale con dicicloesilammina, benzzatina, N-metil-D-glucammina, sali di idrabammina, sali con amminoacidi come arginina, lisina e simili. Sono preferiti i sali non tossici e fisiologicamente accettabili, sebbene altri sali possono essere utili, ad esempio nell'isolamento o purificazione del prodotto. I sali vengono formati utilizzando tecniche convenzionali.

Quelli che seguono sono esempi di attuazioni specifiche della presente invenzione.

Esempio 1

Estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

1,1'-carbonildiimidazolo (0,56 g) fu aggiunto a porzioni ad una soluzione raffreddata (0°C) di acido [[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetico (0,98 g) in 70 ml di acetonitrile. Questa miscela di reazione fu agitata sotto argon a 0°C per 1,5 ore. Il sale HCl di L-tirosina metil estere (0,8 g) fu disciolto in metanolo e neutraliz-

zato con trietilammina (0,35 g). La soluzione fu concentrata sotto vuoto, disciolta in 10 ml di acetonitrile caldo ed aggiunta goccia a goccia alla soluzione sopra indicata dell'estere dell'acido fosfinico attivato nella catena laterale. La miscela di reazione fu agitata per una notte sotto argon e quindi concentrata sotto vuoto. Una soluzione del residuo di fondo in diclorometano fu lavata (H_2O , $NaHCO_3$ acquoso, soluzione salina), essiccata ($MgSO_4$) e filtrata per dare 1,4 g dell'estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

Esempio 2

Estere metilico di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

Trimetilsililbromuro (0,5 ml) fu aggiunto ad una soluzione raffreddata di estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina (1,4 g; si veda l'esempio 1) in 50 ml di diclorometano. Si agitò sotto argon per 2 giorni e si concentrò quindi sotto vuoto. Il residuo fu disciolto in 150 ml di acetato di etile, fu lavato (NaH_2PO_4 acquoso al 10%, soluzione salina) ed essiccato ($MgSO_4$). Il prodotto fu separato dal materiale di partenza mediante estrazione con soluzione di acetato di etile con tre porzioni di $NaHCO_3$ acquoso al 25%. La soluzione del bicarbonato fu acidificata con HCl acquoso al 10% ed estratta con due porzioni da 100 ml di acetato

di etile contenenti 5 ml di isopropanolo. Si essiccò quindi con MgSO_4 , si filtrò e si concentrò sotto vuoto per dare 0,94 g del prodotto analitico.

Calcolato per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}$:

C, 60,96; H, 6,51; N, 3,23; P, 7,15

per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$:

C, 59,72; H, 6,61; N, 3,17; P, 7,0

Trovato: C, 59,56; H, 6,27; N, 3,00; P, 6,7.

Esempio 3

N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina

L'estere metilico di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina (0,86 g; si veda l'esempio 2) fu disciolta in 10 ml di metanolo. Fu aggiunto idrossido di sodio (0,24 g) in 7 ml di acqua e la soluzione fu agitata alla temperatura ambiente per 4 ore. Alla fine di questo periodo di tempo il pH era a pari a 10. Fu evaporato il metanolo e la miscela di reazione fu diluita con 20 ml di acqua, filtrata su filtro Millipore ed il filtrato fu acidificato con KHSO_4 al 10%.

La soluzione acquosa fu saturata con sale, estratta con acetato di etile, essiccata (MgSO_4), filtrata e concentrata sotto vuoto per dare 0,5 g di materiale analitico.

Calcolato per $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$:

C 60,28; H 6,02; N 3,35; P 7,4

per $C_{21}H_{26}NO_6$ P.O,25 H_2O :

C 59,64; H 6,08; N 3,31; P 7,3

Trovato: C 59,44; H 6,13; N 3,05; P 7,1.

Esempio 4

N^2 -[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-arginina

Ad una soluzione di 5 g di acido [etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetico in 132 ml di dimetilformammide (DMF) anidra, alla temperatura ambiente e sotto azoto, furono aggiunti 2,9 g di 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI). Dopo 1 ora alla temperatura ambiente, la miscela di reazione fu trattata con 3,1 g di L-arginina aggiunta come solido in una porzione unica. Dopo agitazione della miscela di reazione per una notte sotto azoto, la DMF fu allontanata sotto vuoto e la miscela greggia di reazione fu disciolta in acqua, acidificata a pH 2 con HCl concentrato ed estratta con etere. La lavorazione dello strato eterico produsse 1,7 g dell'acido di partenza. Il prodotto desiderato fu isolato mediante applicazione dell'estratto acquoso acidificato ad una colonna a scambio ionico (AG50W-X2) (H^+) preparata in acqua. L'eluizione iniziale con acqua allontanò il materiale acidico. Quando il pH ritornò ad un valore prossimo a quello neutro, fu applicato un gradiente da acqua a tampone piridina-acido acetico 0,07 M pH 6,5. Le frazioni positive al Sakaguchi furono raggruppate e liofilizzate per ottenere 2,1 g del prodotto. Que-

sto materiale fu infine purificato su circa 500 ml di resina Sephadex LH-20 in acqua per ottenere 1,9 g del composto nel titolo, con punto di fusione 55-65°C; $[\alpha]_D$ trascurabile.

Calcolato per 1,4 H₂O:

C 51,58; H 7,75; N 12,03; P 6,65.

Trovato: C 51,49; H 7,30; N 11,95; P 6,70.

Esempio 5

N²-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina

Una soluzione di N²-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina (652 mg; si veda l'esempio 4) in 15 ml di 4N acido bromidrico/acido acetico, fu mantenuta alla temperatura ambiente in un pallone chiuso per una notte. La miscela di reazione fu quindi bonificata con un flusso di azoto e trattata ripetutamente con acqua e concentrata in un evaporatore rotante. La liofilizzazione produsse 1,04 g di prodotto greggio. La cromatografia su resina carbossimetil cellulosa leggermente acidica CM-52 (H⁺) produsse un materiale che presentava ancora 0,75 equivalenti di HBr come indicato dalla microanalisi. Il composto nel titolo fu ottenuto alla fine puro per passaggio attraverso una resina a scambio ionico (AG50W-X2 (H⁺)) eluita dapprima con acqua per allontanare HBr, quindi alla fine con piridina acquosa al 5% per dare un totale di 178 mg di prodotto solido e bianco dopo liofiliz-

zazione. Il prodotto era solvatato con 0,7 H₂O.

Esempio 6

Estere fenilmetilico di N-[[[2-feniletil](fenilmetossi)fo-
sfinil]acetil]-L-triptofano

Acido [(2-feniletil)(fenilmetossi)fosfinil]acetico (3,2 g) e 1,1'-carbonildiimidazolo (1,6 g) furono agitati in 50 ml di acetonitrile anidro in un bagno a ghiaccio per 1 ora. La base libera di L-triptofano benzil estere, derivata da 4,8 g del sale cloridrato (da etere/ NaHCO_3) fu aggiunta a poco aceto-nitrile. Dopo agitazione a 0°C per 1 ora, la miscela fu lasciata a riposo alla temperatura ambiente per una notte, ripresa in etere, lavata con NaHSO_4 al 5%, con soluzione salina, con NaHCO_3 a saturazione, con soluzione salina (2 volte), essiccata (Na_2SO_4) ed evaporata a secchezza per dare 5,7 g del prodotto. Questo materiale fu cromatografato a flash su gel di silice LP-1 (400 ml) eluito con acetato di etile e produsse 3,6 g di prodotto sotto forma di olio leggermente colorato.

Analisi: calcolato per $C_{35}H_{31}N_2O_5P$:

C 70,69; H 5,93; N 4,71; P 5,21.

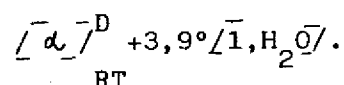
Trovato: C 70,55; H 5,98; N 4,65; P 5,28.

Esempio 7

Sale con ammoniaca di N-[[idrossi(2-feniletil)fosfinil]ace-
til]-L-triptofano

Estere fenilmetilico di N-/(2-feniletil)(fenilme-

tossi)fosfinil/acetil/-L-triptofano (3,3 g; si veda l'esempio 6) fu disciolto in metanolo e fu aggiunto idrossido di litio monoidrato (0,466 g) disciolto in poca acqua. La miscela fu agitata alla temperatura ambiente per 2 ore; fu aggiunto carbone palladiato al 10% (1 g) e la miscela fu idrogenata ad una atmosfera per 2 ore. Il catalizzatore fu filtrato attraverso Celite ed il filtrato fu evaporato a secchezza. Il residuo fu disciolto in acqua, fatto passare attraverso il filtro Millipore e liofilizzato per dare 2,1 g di prodotto, con punto di fusione superiore a 350°C,



Analisi: calcolato per $C_{21}H_{21}N_2O_5PLi_2 \cdot 3H_2O$:

C 52,51; H 5,67; N 5,83; P 6,45; Li 2,89.

Trovato: C 52,44; H 5,03; N 5,64; P 6,40; Li 3,1.

L'elettroforesi mostrava che questo materiale presentava due componenti. Esso (300 mg) fu cromatografato su DEAE sephadex (60 ml) (forma OH, pH 7,4), eluito con gradiente di NH_4HCO_3 (da 0,005 a 0,5 M). Le frazioni pure (contenenti un solo componente per elettroforesi) furono combinate ed evaporate. Il residuo fu disciolto in acqua, filtrato su Millipore e liofilizzato due volte per dare 0,29 g del prodotto, $[\alpha]_{RT}^{D} +3^{\circ}/0,5, H_2O/.$

Analisi: calcolato per $C_{21}H_{23}N_2O_5P(NH_3 \cdot H_2O)$:

C 56,12; H 6,28; N 9,35; P 6,87.

Colonna IColonna II

- | | |
|---|--|
| 16. L-treonina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-treonina |
| 17. L-cisteina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-cisteina |
| 18. L-metionina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-metionina |
| 19. acido L-aspartico | acido N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)
fosfinil]acetil]-L-aspartico |
| 20. acido L-glutammico | acido N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)
fosfinil]acetil]-L-glutammico |
| 21. ϵ -t-butossicar-
bonil-L-lisina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-lisina |
| 22. L-asparagina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-asparagina |
| 23. L-glutammina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-glutammina |
| 24. L-istidina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-istidina |
| 25. L-norvalina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-norvalina |
| 26. L-norleucina | N^2 -[[[idrossi(4-fenilbutil)fosfi-
nil]acetil]-L-norleucina. |

Esempio 27

N -[[[[2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi](4-fenilbutil)fo-

sfinil/acetil/]-L-fenilalanina

A) Estere fenilmetilico dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico

Ad una soluzione di cloroformiato di benzile (1,8 ml, 12,6 mmoli) in 5 ml di tetraidrofurano anidro fu aggiunta goccia a goccia una soluzione dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico (2,55 g, 10 mmoli) e trietilammina (2,0 ml, 14, 5 mmoli) in 30 ml di tetraidrofurano anidro a 0°C. Dopo completamento dell'aggiunta, la miscela fu agitata a 0°C per 30 minuti ed alla temperatura ambiente per 1 ora. La miscela fu posta tra acetato di etile e KHSO_4 al 5% e lo strato di acetato di etile fu evaporato fino ad ottenere un residuo. Il residuo fu ripreso con NaHCO_3 acquoso, lavato con acetato di etile e la soluzione acquosa fu acidificata a pH 1 ed estratta con acetato di etile. Gli estratti furono anidrificati (Na_2SO_4) ed evaporati per dare un prodotto greggio che fu triturato con pentano per dare un solido con punto di fusione 64-67°C (3,30 g).

B) Estere fenilmetilico dell'acido /[(2,2-dimetil-1-ossopropossi)metossi/(4-fenilbutil)fosfinil/acetico

L'estere fenilmetilico dell'acido /idrossi(4-fenilbutil)fosfinil/acetico (3,30 g, 9,5 mmoli) fu ripreso in 10 ml di dimetilformammide anidra e trattato con trietilammina (2,7 ml, 9,5 mmoli) e con clorometil pivalato

(2,8 ml, 19,4 mmoli) e si agitò alla temperatura ambiente sotto argon per 16 ore. La miscela fu diluita con acetato di etile e lavata con acqua, con KHSO_4 al 5% e con NaHCO_3 a saturazione, quindi fu essiccata (Na_2SO_4) ed evaporata fino ad un residuo che fu purificato mediante cromatografia per flash su gel di silice utilizzando l'eluente etil acetato-esano per dare il diestere nel titolo (3,65 g, 83%) sotto forma di olio incolore. TLC R_F (acetato di etile/esano, 1:1) = 0,39.

C) Acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$

L'estere fenilmetilico dell'acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$ (2,95 g, 6,4 mmoli) in 75 ml di acetato di etile fu idrogenato a 48 psi su catalizzatore carbone palladiato al 10% (0,4 g) per 1 ora. La miscela fu filtrata attraverso Celite ed evaporata a secchezza per dare l'acido nel titolo sotto forma di olio incolore che solidificava in un solido con punto di fusione 48-50°C.

D) Estere N-idrossisuccinimmidico dell'acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metil}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$

Acido $\text{[[}(2,2\text{-dimetil-1-ossopropossi)metossi}](4\text{-fenilbutil)fosfinil}]\text{acetico}$ (2,22 g, 6 mmoli), N-idrossisuccinimide (0,69 g, 6 mmoli) e dicicloesilcarbodiimide

(1,24 g, 6 mmoli) furono disciolti in tetraidrofurano anidro a 0°C. La miscela fu agitata per una notte alla temperatura ambiente, filtrata ed il filtrato fu concentrato sotto vuoto fino a dare un residuo oleoso che fu triturato con etere diisopropilico, dando un solido con punto di fusione 102-105°C (2,1 g).

E) N-[[[2,2-dimetil-1-ossopropossi]metossi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-fenilalanina

L-fenilalanina (1,65 g, 10 mmoli), trietilammina (2,8 ml) 20 mmoli) ed estere N-idrossisuccinimmidico dell'acido [[[2,2-dimetil-1-ossopropossi]metossi](4-fenilbutil)fosfinil]acetico (4,67 g, 10 mmoli) vengono disciolti in 50 ml di dimetilformammide anidra e si agita per una notte sotto argon alla temperatura ambiente. La miscela di reazione viene suddivisa tra diclorometano e KHSO_4 al 5% e lo strato organico viene lavato con acqua e con soluzione salina e quindi essiccato ed evaporato per dare il prodotto desiderato.

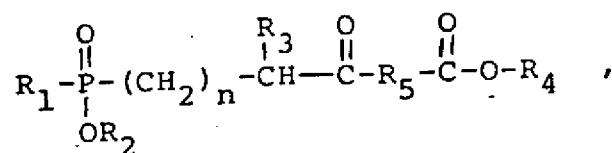
Esempio 28-34

Seguendo la procedura dell'esempio 27, ma sostituendo il composto nella colonna I in luogo dell'acido [idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetico, il composto nella colonna II in luogo del clorometil pivalato ed il composto nella colonna III in luogo di L-fenilalanina, si ottiene il composto elencato nella colonna IV.

<u>Colonna I</u>	<u>Colonna II</u>		<u>Colonna III</u>
28. Acido <u>/idrossi(4-fenil</u> butil)fosfinil/acetico	clorometil pivalato	L-alanina	N- <u>/</u> <u>/</u> <u>/</u> (2,2-dimetil)-ossopropossi/etossi/4-fenilbutil)fosfinil/acetil/-L-alanina
29. Acido <u>/idrossi(4-fenil</u> butil)fosfinil/acetico	estere 1-cloro etilico dell'a cido acetico	L-fenilalanina	N- <u>/</u> <u>/</u> <u>/</u> 1-(acetilossi)etossi/4-fenilbutil)fosfinil/acetil/-L-fenilalanina
30. Acido <u>/idrossi(2-fenil</u> etil)fosfinil/acetico	estere clorome tilico dell'aci do isobutirrico	L-triptofano	N- <u>/</u> <u>/</u> <u>/</u> (2-metil-1-ossopropossi)metossi-4-fenilbutil)fosfinil/acetil/-L-triptofano
31. Acido <u>/idrossi(4-fenil</u> butil)fosfinil/acetico	diestere etil clorometilico dell'acido car bonico	L-fenilalanina	N- <u>/</u> <u>/</u> <u>/</u> (etossicarbonilossi)metossi/4-fenilbutil)fosfinil/acetil/-L-fenilalanina
32. Acido <u>/idrossi(ottil)</u> fosfinil/acetico	estere 1-cloro etilico dell'a cido propionico	L-tirosina	N- <u>/</u> <u>/</u> ottil/1-(1-ossopropossi)etossi/fosfinil/acetil/-L-tirosina
33. Acido <u>/esil(idrossi)</u> fosfinil/acetico	1-cloroetil pi valato	L-metionina	N- <u>/</u> <u>/</u> <u>/</u> 1-(2,2-dimetil-1-ossopropossi)etossi/esil)fosfinil/acetil/-L-metionina
34. Acido <u>/idrossi(4-fenil</u> butil)fosfinil/- α - metilpropionico	1-cloroetil pi valato	L-arginina	N- <u>/</u> 2-metil-1-osso- <u>/</u> <u>/</u> 1-(1-ossopropossi)etossi/4-fenilbutil)fosfinil/propil-L-arginina.

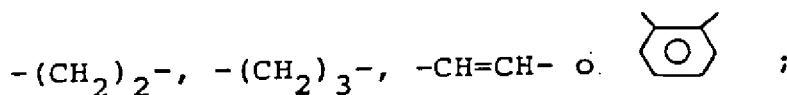
RIVENDICAZIONI

1. Composto avente la formula



o sale relativo, in cui R_1 è alchile, arile, arilalchile, cicloalchile o cicloalchil (alchile);

R_2 e R_4 sono ciascuno indipendentemente idrogeno, alchile, arilalchile o $-\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$, dove X è idrogeno, alchile o fenile e Y è idrogeno, alchile, fenile o alcoli, oppure X e Y sono assieme



R_3 è idrogeno o alchile;

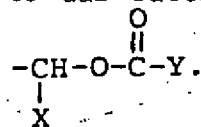
$-\text{R}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ è un residuo di un ammino acido scelto nel gruppo consistente di glicina, alanina, valina, norvalina, leucina, N-metilleucina, norleucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, serina, treonina, cisteina, metionina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, lisina, asparagina, glutamina, istidina, o triptofano; e

n è 0 oppure 1.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che n è 1.
3. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizza-

to dal fatto che R_2 e R_4 sono entrambi idrogeno.

4. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che uno tra R_2 e R_4 è idrogeno e l'altro è



5. Composto secondo la rivendicazione 1, estere metilico di N-[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

6. Composto secondo la rivendicazione 1, estere metilico di N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

7. Composto secondo la rivendicazione 1, N-[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-tirosina.

8. Composto secondo la rivendicazione 1, N^2 -[[etossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina.

9. Composto secondo la rivendicazione 1, N^2 -[[idrossi(4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-L-arginina.

10. Composto secondo la rivendicazione 1, estere fenilmetilico di N-[[[(2-feniletil)(fenilmetossi)fosfinil]acetil]-L-triptofano.

11. Composto secondo la rivendicazione 1, sale di ammoniaca di N-[[idrossi(2-feniletil)fosfinil]acetil]-L-triptofano.

DICHIARAZIONE E PROCURA

Domanda originale

Quale sottoscritto inventore, io dichiaro che:

la mia residenza, l'indirizzo postale e la cittadinanza sono come più oltre indicato presso il mio nome; che

in verità ritengo di essere l'originale, primo e solo inventore dell'invenzione avente il titolo:

FOSFINILALCANOIL AMMINO ACIDI

che è descritta e rivendicata nella descrizione allegata; che

non so e non ritengo che la stessa fosse nota od in uso negli Stati Uniti d'America prima della mia invenzione o brevettata o descritta in pubblicazioni in qualche paese prima della mia invenzione, o più di un anno prima della presente domanda, od in uso pubblico od in vendita negli Stati Uniti d'America più di un anno prima della presente domanda, che l'invenzione non è stata brevettata o fatta oggetto di un certificato d'inventore rilasciato anteriormente alla data della presente domanda in alcun paese straniero in base ad una domanda depositata da me o dai miei legali rappresentanti o cessionari più di dodici mesi prima della presente domanda, che conosco il mio dovere di rivelare le informazioni delle quali

sono a conoscenza che possano costituire materiale per l'esame della presente domanda, e che nessuna domanda di brevetto o certificato d'inventore in relazione alla presente domanda è stato depositato da me o dai miei legali rappresentanti o cessionari in alcun paese straniero ad eccezione di quelli qui di seguito elencati:

nessuno

Nomino con la presente i seguenti procuratori e/o agenti per l'inoltro della presente domanda e per evadere tutte le pratiche ad essa relative presso l'Ufficio Brevetti e Marchi:

Lawrence S. Levinson Registrazione No. 17.663

Donald J. Barrack registrazione No. 26.414

Indirizzare tutte le chiamate telefoniche a: Donald J. Barrack

Tel. No. (609)921 - 4328

Indirizzare tutta la corrispondenza a:

Lawrence S. Levinson

E. R. Squibb-Sons, Inc.

P.O. Box 4000

Princeton, New Jersey 08540.

Dichiaro inoltre che tutte le dichiarazioni contenute nella presente, per quanto risulta a mia conoscenza, sono veritiere, e che tutte le dichiarazioni rilasciate su informazione e credenza sono da ritenersi veritiere;

ed inoltre che queste dichiarazioni sono state fatte sapendo che dichiarazioni volontariamente false e simili sono punibili mediante contravvenzione, o reclusione, od entrambi, ai sensi dell'articolo 1001, paragrafo 18, del Codice degli Stati Uniti, e che dette dichiarazioni volontariamente false possono pregiudicare la validità della domanda o di qualsiasi brevetto che ne risulti.

Nome completo dell'inventore:

Edward W. Petrillo Jr. (Firma)

Data: 19 novembre 1981

Residenza: Pennington, N.J.

Cittadinanza: Stati Uniti

Indirizzo postale: 433 Sked Street, Pennington, N.J. 08534.

PER TRADUZIONE CONFORME

JACOBACCI - CASETTA & PERANI
S.p.A.

