

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145740 B

- (21) Ansøgning nr. 2677/71 (51) Int.Cl.³ C 07 C 103/52
- (22) Indleveringsdag 2. jun. 1971
- (24) Løbedag 2. jun. 1971
- (41) Alm. tilgængelig 5. dec. 1971
- (44) Fremlagt 14. feb. 1983
- (86) International ansøgning nr. -
- (86) International indleveringsdag -
- (85) Videreførelsesdag -
- (62) Stamansøgning nr. -
- (30) Prioritet 4. jun. 1970, 43595, US 12. feb. 1971, 115045, US
- (71) Ansøger NORWICH EATON PHARMACEUTICALS INC., Norwich, US.
- (72) Opfinder Frank Sipos, US: Donald Theodore Pals, US: George Smith Denning Jr., US.
- (74) Fuldmægtig Kontor for Industriel Eneret ved Svend Schønning.
-
- (54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af hepta- eller okta-peptider.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte hepta- eller oktapeptider med den i patentkravets indledning viste alment formel, hvor R , R^1 og R^2 har de sammesteds angivne betydninger. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del angivne.

De omhandlede peptider har farmakologisk virkning. Nogle af dem kan inhibere pressoreffekten af angiotensin II på blodtrykket. Når de således indgives ved intravenøs infusion i levende rotter i den meget ringe mængde 20 mikrogram/kg/minut, inhiberes pressoreffekten for angiotensin II som

DK 145740 B

er indgivet på lignende måde. På grund af denne inhiberende egenskab på en blodtryksforøgelse bevirket af antiotensin II er de omhandlede peptider værdifulde midler til at modvirke hypertension som beror på angiotensin II. Forbindelserne inhiberer endvidere hypertension hos rotter med akut ensidig nyrehypertension efter intravenøs infusion. Virkningerne belyses nærmere sidst i beskrivelsen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal i det følgende beskrives nærmere ved et udførelseseksempel.

10 Eksempel

L-asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-proyll-L-alanin:

BOC-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(OBzl)-Val-His(N^{im}-Bzl)-Pro-Ala-polymer (A) (Bzl = benzyl)

15 5 g (0,5 mmol/g) BOC-ala-harpiksester anbragtes i en 200 ml stor Merrifield reaktionsbeholder af vuggende type. Harpiksen kvældedes i kloroform (analysekvalitet) ved vugning i 20 minutter og vaskedes derefter med 3 x 50 ml iseddike. Perioden for hver vaskeoperation var 3-5 minutter.

20 t-Butoxykarbonyl-beskyttelsesgruppen (BOC) fjernedes med 1N HCl i vandfri eddikesyre ved vugning i 40 minutter. Harpiksen vaskedes successivt tre gange med eddikesyre, 3 gange med absolut ætanol og tre gange med N,N-dimetylformamid. Det vundne hydroklorid af alanylharpiksester neutraliseredes med en 10% opløsning af triætylamin i dimetylformamid

25 ved vugning i 10 minutter. Derefter vaskedes harpiksen med tre portioner dimetylformamid, tre portioner absolut ætanol, tre portioner kloroform og tre portioner metylenklorid, og der tilsattes en opløsning af 8,5 mmol (tredobbelt overskud)

30 af BOC-prolin i 40 ml metylenklorid. Derefter vuggedes i 20 minutter, så at aminosyrederivatet kunne få tilstrækkelig tid til at penetrere harpiksen. Derpå tilsattes 8,5 mmol N,N'-dicyklohexylkarbodiimid i 10 ml metylenklorid, og man lod koblingen foregå i 12 timer under vugning. Derefter vaskedes harpiksen med tre portioner metylenklorid, tre portioner absolut ætanol og tre portioner eddikesyre og var

35

hermed parat til næste fjernelse af beskyttelsesgruppen med HCl i eddikesyre som beskrevet ovenfor. Vaskningen, neutraliseringen og koblingstrinnet udførtes på den beskrevne måde under anvendelse af BOC-His(N^{im}-Bzl)-OH, BOC-Val-OH, BOC-Tyr(O-Bzl)-OH og BOC-Arg(NO₂)-OH. En ændring foretoges ved koblingstrinnet for BOC-His(N^{im}-Bzl)-OH og BOC-Arg(NO₂)-OH, i hvilket tilfælde der anvendtes en blanding af dimetylformamid og metylenklorid 2:1 som opløsningsmiddel. Koblingen af Asn til det for beskyttelsesgruppen befriede harpiksheptapeptid udførtes under anvendelse af BOC-Asn-ONP (BOC-asparagin-p-nitrofenylester) i dimetylformamid ved at blandingen vuggedes i 72 timer.

Efter det sidste koblingstrin vaskedes harpikspeptidet med dimetylformamid, ætanol, eddikesyre og ætanol og tørredes i vakuum over P₂O₅. Harpikspeptidets vægt var 7,3 g.

H-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(O-Bzl)-Val-His(N^{im}-Bzl)-Pro-Ala-OH.
2HBr (B) -----

7,3 g af harpikspeptidet A, fremstillet som beskrevet ovenfor, suspenderedes i 25 ml tør trifluoreddikesyre og der gennemleddes en strøm af tør HBr med lav hastighed. Efter 20 minutters forløb frafiltreredes harpiksen og behandledes yderligere én gang med HBr/CF₃COOH i 40 minutter. Filtratet indampedes til tørhed i vakuum ved 20°C, de olieagtige remanenser udfældedes med absolut æter og produktet tørredes i desikkator over kaliumhydroxyd. Det samlede udbytte var 1980 mg (59,8%) af det beskyttede oktapeptid-dihydrobromid.

H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH (C)

1,0 g af det beskyttede peptid B opløstes i 20 ml af en blanding af eddikesyre, dioxan og vand i rumfangsforholdet 4:4:1, og der foretoges hydrogenolyse over Pd/BaSO₄ (10% katalysator, 0,5 g) i 48 timer ved atmosfæretryk. Efter denne periodes forløb tilsattes der en ny portion på 0,2 g katalysator og hydreringen fortsattes i 24 timer. Den filtrerede og fortyndede opløsning frysetørredes. Udbyttet

var 750 mg, smeltepunkt 150-165°C. Beregnet for dihydrobromid: 15,32% Br, fundet 13,36% Br.

Råproduktet rensedes ved gelfiltreringskromatografi på "Sephadex" G-25 i 0,2M eddikesyre ("Sephadex" er et i Danmark indregistreret varemærke). De fraktioner som indeholdt det rene peptid forenedes og frysetørredes. Den rensede forbindelse indeholdt spor af halogen.

Tyndlagskromatografi Merck's cellulose-F-plader, opløsningsmiddelsystem n-butanol/eddikesyre/vand i rumfangsforholdet 6:2:3, R_f 0,35. Merck kiselgel F-254-plader med samme opløsningsmiddelsystem, R_f 0,13. $[\alpha]_D^{20} = -59,4^\circ$ ($c = 0,2$ i 1N AcOH, $[\alpha]_{578}^{20} = -61,1^\circ$ ($c = 0,2$ i 1N AcOH).

Aminosyreanalyse:

Ala: 1,00, Arg: 1,00, Asn: 1,09, His 0,90, Pro 1,04, Tyr 0,75, Val 1,94.

På lignende måde fremstilledes andre peptider ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved indførelse af den nødvendige aminosyreenhed på et passende stadium. De således fremstillede peptider er angivet i de efterfølgende tabeller I-III, hvor TLC betyder tyndlagskromatografi. I disse tabeller har man i overensstemmelse med IUPAC-nomenklaturen for at skille L- og D-formerne af aminosyrer i polypeptider markeret L-aminosyrer med stort begyndelsesbogstav, mens D-aminosyrer er markeret med lille begyndelsesbogstav.

Tabel I

Peptid (formel, molekylvægt)	Specifik rotation (koncentration og opløsningsmiddel)	Merck kiselgel- F-254-plader butanol/eddike- syre/vand (6:2:3); ninydrin-detek- tering R_f	TLC på Merck cel- lulose F- 254-plader R_f
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{23} = -81,33^\circ$ (c = 0,22, 1N AcOH)	0,20	0,50
[C ₄₃ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₁ , MV 955,1]	$[\alpha]_D^{23} = -70,55^\circ$ (c = 1, 1N AcOH)	0,15	0,65
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{26} = -87,32^\circ$ (c = 0,2, 1N AcOH)	0,10	0,60
[C ₄₆ H ₇₂ N ₁₄ O ₁₁ , MV 997,2]	$[\alpha]_D^{23} = -64,90^\circ$ (c = 1, 1N AcOH)	0,40	0,70
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{23} = -101,62^\circ$ (c = 0,3, 1N AcOH)	0,03	0,45
[C ₄₃ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₂ , MV 956,1]	$[\alpha]_D^{24} = -68,31^\circ$ (c = 0,24, 1N AcOH)	0,02	0,20
H-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH			
[C ₃₉ H ₆₀ N ₁₂ O ₉ , MV 941,0]			

Tabel II

Peptid (formel, molekylvægt)	Specifik rotation (koncentration, opløsningsmiddel)	TLC på Merck kiselgel-F-254-pla- der (ninhhydrindetektering)	butanol/eddike- syre/vand (6:2:3)	butanol/eddike- syre/pyridin/ vand (9:2:7:6)
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH (C ₄₂ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₀ , mv 912,11)	[α] _D ²³ = -84,41° (c = 0,24, 1N AcOH)	0,05		0,30
H-Ser-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH (C ₄₂ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₁ , mv 928,11)	[α] _D ²⁴ = -69,00° (c = 0,2, 1N AcOH)	0,02		0,38
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-leu-OH (C ₄₆ H ₇₂ N ₁₄ O ₁₁ , mv 997,22)	[α] _D ¹⁹ = -54,40° (c = 0,25, 1N AcOH)	0,15		0,50
Succinamyl-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala- OH (C ₄₃ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₁ , mv 940,12)	[α] _D ²¹ = -83,14° (c = 0,25, 1N AcOH)	0,10		0,20
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH (C ₄₂ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₁ , mv 941,11)	[α] _D ²³ = -54,90° (c = 1,0, 1N AcOH)	0,10		0,25
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ile-OH (C ₄₆ H ₇₂ N ₁₄ O ₁₁ , mv 997,22)	[α] _D ¹⁷ = -55,33° (c = 0,3, 1N AcOH)	0,09		0,40

Tabel III

Peptid (formel, molekylvægt)	Specifik rotation (koncentration, opløsningsmiddel)	TLC på Merck kiselgel-F-254-pla- der (detektering med Paulys reagens) butanol/eddike- syre/vand (6:2:3)	butanol/eddike- syre/vand/pyri- din (9:2:6:7)
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{26} = -74,6^\circ$	0,15	0,25
(C ₄₁ H ₆₃ N ₁₃ O ₁₀ , 898,10)	(c = 0,57, N AcOH)		
H-Pro-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{21} = -81,0^\circ$	0,10	0,35
(C ₄₃ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₀ , 924,12)	(c = 0,53, N AcOH)		
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{21} = -67,0^\circ$	0,15	0,32
(C ₄₂ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₁ , 941,11)	(c = 0,51, N AcOH)		
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-β-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -59,0^\circ$	0,05	0,25
(C ₄₂ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₀ , 912,10)	(c = 0,52, N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-β-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -53,7^\circ$	0,15	0,45
(C ₄₃ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₁ , 955,10)	(c = 0,53, N AcOH)		
H-Gly-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -80,3^\circ$	0,25	0,32
(C ₄₁ H ₆₃ N ₁₃ O ₁₀ , 898,09)	(c = 0,56, N AcOH)		
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{17} = -56,7^\circ$	0,15	0,45
(C ₄₆ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₀ , 968,22)	(c = 0,30, N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{21} = -77,5^\circ$	0,25	0,35
(C ₄₇ H ₇₄ N ₁₄ O ₁₁ , 1011,25)	(c = 0,54, N AcOH)		
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{21} = -80,5^\circ$	0,28	0,35
(C ₄₃ H ₆₇ N ₁₃ O ₁₀ , 926,14)	(c = 0,54, N AcOH)		

Tabel III (fortsat)

Peptid (formel, molekylvægt)	Specifik rotation (koncentration, opløsningsmiddel)	TLC på Merck kiselgel-F-254-pla- der (detektering med Paulys reagens) butanol/eddike- syre/vand (6:2:3)	butanol/eddike- syre/vand/pyri- din (9:2:6:7)
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -63,7^\circ$		
(C ₄₄ H ₆₈ N ₁₄ O ₁₁ , 969,17)	(c = 0,52, N AcOH)	0,10	0,38
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{19} = -48,4^\circ$		
(C ₄₃ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₁ , 955,14)	(c = 0,25, N AcOH)	0,05	0,30
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ala-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -68,2^\circ$		
(C ₄₁ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₁ , 927,03)	(c = 0,50, N AcOH)	0,10	0,35

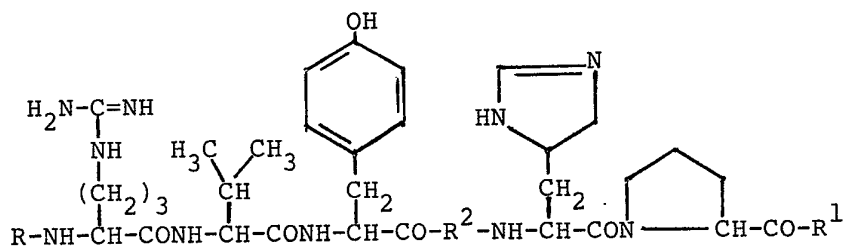
En række af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede peptider blev afprøvet i de to side 2 nævnte henseender. Resultaterne fremgår af tabel IV. Første resultatkolonne viser antagonismen til angiotensin II efter intravenøs infusion af 0,1 µg/kg af forbindelsen i rotter med overskåret rygmarv, idet infusionen skete med en hastighed på 20 µg/kg/min. De andre kolonner viser resultatet af intravenøs infusion af testforbindelsen i vågne, akut 6-7 dages ensidigt nyrehypertensive rotter til opnåelse af effektiv blodtryksnedsættelse; tabellens anden talkolonne viser infunderet dosis og sidste kolonne blodtrykssænkningen i procent.

Tabel IV

Peptid	% antago- nisme	Dosis	% blodtryk- nedsættelse
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	39,3	200 µg/kg/min	17,0
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	88,2	100 µg/kg/min	32,0
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	78,4	100 µg/kg/min	34,5
Succinyl-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	0	16 mg/kg/min	33,3
H-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	19,3	4 mg/kg/min	33,0
H-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	74,6	100 µg/kg/min	25,0
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	97,9	5 µg/kg/min	28,2
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	99,5	10 µg/kg/min	27,5
H-Ser-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	58,6	200 µg/kg/min	24,2
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	32,7	1 mg/kg/min	14,8
Succinamyl-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	44,1	1 mg/kg/min	9,1
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ile-OH	88,1	100 µg/kg/min	14,3
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-leu-OH	0	3,2 mg/kg/min	12,3

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåde til fremstilling af hepta- eller oktapeptider med den almene formel



- 5 hvor R betegner hydrogen, succinyl, L-aspartyl, sarkosyl, L-seryl, succinamyl, L-prolyl, glycyl eller D- eller L-asparaginyl, R^1 betegner en L-alanin-, L- eller D-leucin-, glycyl-, L-isoleucin- eller β -alaninrest og R^2 betegner L-valyl, L-isoleucyl eller L-alanyl, k e n d e t e g n e t ved at
- 10 man under anvendelse af i peptidkemien sædvanlige metoder trinvis sammenkobler syrerne HR^1 , prolin, histidin, R^2 -OH, tyrosin, valin, arginin og, såfremt R ikke skal være hydrogen, tillige syren ROH, hvor R^1 , R^2 og R har de ovenfor angivne betydninger, til dannelsen af amidbindinger mellem sy-
- 15 rerne, hvorved amino- og karboxylgrupper som man ikke ønsker skal deltage i reaktionen, på i og for sig kendt måde maskeres midlertidigt med en beskyttelsesgruppe eller på anden måde hindres i at deltage i reaktionen.

Fremdragne publikationer:
