

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 491 463

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 01362

(54) Nouveaux dérivés anticoagulants de l'agmatine et leur procédé de préparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 C 129/12; A 61 K 31/155, 37/02; C 07 C 103/52.

(22) Date de dépôt..... 26 janvier 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Hongrie, 7 octobre 1980, n° GO-1449.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 14 du 9-4-1982.

(71) Déposant : Société dite : RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT., résidant en Hongrie.

(72) Invention de : Sándor Bajusz, Erzsébet Széll, née Hasenöhr, Eva Barabás, Dániel Bagdy et Zsuzsanna Mohai, née Nagy.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Orès,
6, av. de Messine, 75008 Paris.

La présente invention est relative à de nouveaux dérivés de l'agmatine et à leurs sels représentés par la formule générale (I) ci-après, ainsi qu'à un procédé pour leur préparation :



dans laquelle :

- X représente une fraction α -amino acide de configuration D, comportant une chaîne latérale constituée par un alkyle inférieur contenant un groupe phényle, phényl-alkyle inférieur ou phényl-hétéroatome,
- Pro représente, selon la littérature [c'est-à-dire Biochem. J., 126, 773 (1972)], un résidu L-proline,
- Agm représente un groupe agmatine,
- B représente un résidu d'acide et
- n est égal à 0, 1 ou 2.

Il est connu que les dérivés acylés simples de l'agmatine (1-amino-4-guanidino-butane), tels que par exemple, la tosylagmatine [1-(p-toluène-sulfonylamido)-4-guanidino-butane], sont capables d'inhiber les réactions protéolytiques à la fois de la trypsine et de la thrombine [Lorand et Rule : Nature, 190, 722 (1961) ; Rule et Lorand : Biochem. Biophys. Acta, 81, 130 (1964)]. Selon les auteurs mentionnés ci-dessus, la tosyl-agmatine retarde la coagulation du plasma sanguin et supprimerait également la réaction fibrinogène-thrombine. Toutefois, selon les expériences menées par la Demanderesse, la réaction fibrinogène-thrombine est modifiée par la tosyl-agmatine, qu'à un degré très négligeable : il faut 0,7 mg de tosyl-agmatine pour doubler (de 15 à 30 secondes) le "temps de thrombine" d'un ml d'une solution contenant 1,25 mg de fibrinogène et 1,25 unités NIH de thrombine ("Minimum Requirements of Dried Thrombin", 2ème rev. D.V. Biol. Conf. Natl. Inst. Health, Bethesda, Md., USA, 1946).

La présente invention a pour but de pourvoir à

de nouveaux dérivés de l'agmatine présentant une activité anticoagulante accrue.

La Demanderesse est parvenue à mettre en évidence que les nouveaux dérivés dipeptidyles de l'agmatine représentés par la formule générale (I) ci-dessus, dans lesquels X, Pro, Agm, B et n sont tels que définis plus haut, présentent un pouvoir anticoagulant significatif. Il est particulièrement favorable si la chaîne latérale portée par le N terminal de la fraction D- α -amino acide de la dipeptidyl-agmatine est un groupe phényl-alkyle inférieur : c'est ainsi que la D-phénylalaninyl-L-prolyl-agmatine possède une activité extrêmement élevée.

Le Tableau 1 qui va suivre montre l'effet exercé par les nouveaux dérivés de l'agmatine conformes à la présente invention, représentés par la formule générale (I) et par la tosyl-agmatine connue sur la réaction fibrinogène-thrombine. L'activité des substances est définie par la quantité de composé nécessaire pour doubler le temps de thrombine du fibrinogène. De plus, l'activité relative des nouveaux dérivés de l'agmatine par rapport à celle de la tosyl-agmatine (l'activité de ce dernier médicament étant 1) est également fournie.

L'activité des composés a été évaluée dans le système suivant :

- 25 0,2 ml de 0,5 % de fibrinogène bovin dans une solution de NaCl à 0,9 %, 0,1 ml d'une solution tampon de chlorhydrate de tris-(hydroxyméthyl)-méthylamine, (pH = 7,4) contenant le dérivé d'agmatine, et
- 30 0,1 ml de thrombine humaine standard US (US Standard Human Thrombin), 5 unités NIH/ml.

Le temps de thrombine du système ne contenant pas de dérivé d'agmatine est de 15 secondes.

TABLEAU 1

Quantité de dérivé d'agmatine nécessaire pour doubler le temps de thrombine du fibrinogène

5	Dérivé *	µg/mélange réactionnel	Activité relative
	H-D-Phg-Pro-Agm	1,4	200
	H-D-Ser(Bzl)-Pro-Agm	0,7	400
10	H-D-Phe-Pro-Agm	0,12	2333
	Tosyl-agmatine	280	1

* Les abréviations utilisées pour les résidus d'acide aminé et les dérivés peptidiques dans ce tableau et dans les tableaux suivants, sont celles qui sont conformes à la littérature [Biochem. J., 126, 773 (1972)] ; de plus, Phg représente la phénylglycine, Agm l'agmatine ; Bzl, Z et Boc représentent respectivement les radicaux benzyle, benzyloxycarbonyl et t-butyloxycarbonyl. Le groupe -D-Ser(Bzl) représente un résidu O-benzyl-D-sérine.

La Demanderesse a, de plus, pu mettre en évidence que l'effet anticoagulant des nouveaux dérivés de dipeptidyl-agmatine de formule générale (I) est augmenté par la présence d'héparine industrielle utilisée dans des buts thérapeutiques. Ce fait peut être démontré à la fois par des expériences in vitro et in vivo.

Dans les essais in vitro, l'effet de la D-Phe-Pro-Agm, 2HCl (dans la formule générale (I) , X représente la fraction D-phénylalanine, B est l'ion chlorure et n = 2) et de l'héparine a été étudié dans un système isolé, dans un mélange réactionnel (A) de fibrinogène-thrombine et dans du plasma (B) humain citraté :

A : 0,2 ml de 0,5 % de fibrinogène bovin dans une solution saline à 0,9 %, 0,1 ml d'un tampon de chlorhydrate de tris-(hydroxy-

méthyl)-méthylamine, (pH = 7,4), contenant le dérivé d'agmatine et/ou l'héparine (132,2 U/mg U.S. Ph. XVII), et

0,1 ml de thrombine humaine standard US à 10 unités NIH/ml.

5 Le temps de thrombine du système dépourvu d'inhibiteur est de 15 secondes.

B : 0,2 ml de plasma humain citraté

0,1 ml de tampon de chlorhydrate de tris-(hydroxyméthyl)-méthylamine, (pH = 7,4), contenant le dérivé d'agmatine et/ou l'héparine (132,2 U/mg U.S. Ph. XVII), et

10 0,1 ml de thrombine humaine standard U.S. à 10 U NIH/ml.

Le temps de thrombine du système dépourvu d'inhibiteur est de 15 secondes.

15 Les résultats obtenus ont été réunis dans le tableau 2 qui va suivre : ils montrent comment le temps de thrombine est prolongé par chaque médicament utilisé seul et par une combinaison de ces derniers dans des systèmes A et B respectivement, ainsi que le temps de thrombine calculé sur la base des activités individuelles (le temps de thrombine en l'absence d'inhibiteur étant égal à 1).

La dose quotidienne des composés de formule générale (I) à administrer aux adultes s'élève à 50 - 100 mg/heure lorsqu'ils sont administrés par perfusion intraveineuse pendant 6 à 12 heures par jour.

La dose quotidienne des composés de formule générale (I) à administrer en combinaison avec l'héparine aux adultes, s'élève à 50-60 mg de peptide conjointement avec 3500-4500 U d'héparine lorsqu'ils sont administrés trois à quatre fois par jour.

35 30 25 20 15 10 5

TABLEAU 2

Effet anticoagulant du D-Phe-Pro-Agm,2 HCl augmenté par l'héparine dans un système isolé (A) et dans du plasma humain citraté (B)

Temps de thrombine relatif						
D-Phe-Pro-Agm*	Héparine	D-Phe-Pro-Agm*	Héparine	D-Phe-Pro-Agm + Héparine		
µg/ml de mélange réactionnel			seul	calculé		titré
<u>A</u>						
0,10	0,05	2,5	1,1	2,6		4,0
0,10	0,10	2,5	1,5	3,0		6,0
0,10	0,20	2,5	2,0	3,5		9,0
0,20	0,05	4,0	1,1	4,1		7,5
0,20	0,10	4,0	1,5	4,5		13,0
0,20	0,20	4,0	2,0	5,0		22,0
<u>B</u>						
0,05	0,05	2,2	1,0	2,2		4,0
0,05	0,10	2,2	2,0	3,2		6,2
0,05	0,20	2,2	3,8	5,0		9,5
0,10	0,05	3,4	1,0	3,4		7,8
0,10	0,10	3,4	2,0	4,4		13,0

* D-Phe-Pro-Agm,2 HCl

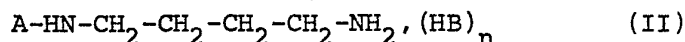
Dans des essais in vivo, on administre par voie sous-cutanée, à des lapins gris pesant 2 à 3 kg, les doses suivantes :

- a - 5 mg/kg d'héparine (132,2 U/mg U.S. Ph. XVII),
- 5 b - 10 mg/kg de D-Phe-Pro-Agm, 2HCl ou
- c - 5 mg/kg d'héparine et 10 mg/kg de D-Phe-Pro-Agm, 2HCl.

Après avoir administré les médicaments, on a prélevé des échantillons de sang toutes les trente minutes, de la veine auriculaire des lapins et on a déterminé le temps de thrombine du sang total dans un thromboélastographe [Hartert, H : Zschr. f. Clin. Med. 153, 423 (1955)]. Au cours des expériences, il est apparu nettement que l'héparine seule et le dérivé d'agmatine seul ne présentent qu'une faible activité aux doses administrées (essais (a et b)) ; le temps de thrombine du sang total n'est prolongé que de 1,5 fois (le temps de thrombine relatif est de 1,2 à 1,5 au mieux) et qu'également, l'activité de la prothrombine du sang, n'est pratiquement pas modifiée. Si le dérivé d'agmatine est administré conjointement avec l'héparine, aux mêmes doses (c), on enregistre une augmentation de l'effet anticoagulant chez les animaux soumis à l'expérimentation, le temps de thrombine relatif est multiplié par 4 à 5 pendant 3 à 4 heures dans les essais témoins. Parallèlement, l'activité de la prothrombine dans des échantillons sanguins prélevés à différents intervalles, et évaluée selon la méthode de Quick [A.J. Quick : J. Biol. Chem. 109, 73 (1935)] est réduite et passe ainsi de 100 % avant traitement à 20-30 %. Selon la littérature, on peut considérer que cette valeur correspond à un effet anticoagulant intéressant du point de vue thérapeutique.

La présente invention a, en outre, pour objet un procédé de préparation de nouveaux dérivés de l'agmatine représentés par la formule générale (I), dans laquelle X, Pro, Agm, B et n sont tels que définis plus haut, par condensation d'un dérivé du 1,4-diamino-butane repré-

senté par la formule générale (II) ci-après :



dans laquelle :

- A représente une fraction $H_2N-C(NH)-$, $Y-HN-C(NH)-$ ou
 5 Q, Y et Q représentant des groupes protecteurs de fonctions amine, utilisés habituellement dans la chimie des peptides,
 B est un résidu d'acide et
 n est égal à 0, 1 ou 2,
 10 avec une L-proline dont le groupe amine est bloqué, puis avec l'acide aminé suivant ou avec un L-proline-peptide, selon des méthodes connues en chimie des peptides, le groupe protecteur Q étant éventuellement séparé de la fraction 1,4-diamino-butane de composé préparé ; le groupe
 15 amine, libéré, est converti en groupe guanidino selon des méthodes connues ; on enlève de la dipeptidyl-agmatine résultant à la fois le groupe protecteur du radical amine terminal et éventuellement le groupe Y bloquant la fraction guanidino et l'on isole la dipeptidyl-agmatine libre sous
 20 la forme d'un sel.

- Conformément à la présente invention, on prépare de préférence des composés représentés par la formule générale (I) dans lesquels X est un résidu D-phényl-alanine, en formant un anhydride mixte à partir du Z-D-Phe-Pro-OH
 25 [Nikolaides et coll. : J. Med. Chem., 11, 74 (1968)] et d'un alkylester de l'acide chloroformique, puis en faisant réagir cet anhydride mixte avec du chlorhydrate d'agmatine (dans la formule générale (II), A représente un groupe $H_2N-C(NH)-$, B est un atome de chlore et $n = 1$) ou
 30 avec une agmatine portant un groupe benzyloxycarbonyle (Z) sur son groupe guanidino (dans la formule générale (II), A représente un groupe $Y-HN-C(NH)-$, Y un groupe Z et $n = 0$), on sépare le ou les groupes protecteurs Z de la dipeptidyl-agmatine bloquée formée, puis on isole la
 35 D-Phe-Pro-Agm sous la forme d'un sel.

Conformément à la présente invention, on peut

également condenser la 4-(tert.-butyloxycarbonylamido)-butylamine (dans la formule générale (II), A est identique à Q et représente un groupe tert.-butyloxycarbonyle(Boc) et $n = 0$), [Geiger : Liebigs, Ann. Chem. 750, 165 (1971)]
5 avec de la benzyloxycarbonyl-L-proline selon une méthode connue [Fuchs et coll. : Liebigs Ann. Chem., 1977, 602] ; on sépare le groupe Boc du condensat ; le groupe amine libéré est converti en groupe guanidino et le groupe Z est éliminé du Z-Pro-Agm-Z formé, puis on combine un α -amino
10 acide dont le groupe amine porte un groupe protecteur convenable (c'est-à-dire Boc-D-Ser(Bzl)-OH, Z-D-Phg-OH) à la Pro-Agm et enfin on élimine le groupe protecteur de la fonction amine terminale de la dipeptidyl-agmatine et on isole la dipeptidyl-agmatine libre sous la forme d'un sel.
15 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des
20 exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre, sont uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.
25

Les valeurs de R_F ont été déterminées par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Kieselgel G, REANAL, Budapest) dans les systèmes de solvants suivants :

- 30 1 - chloroforme-méthanol - (9 : 1)
 2 - acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-
 eau : 240 : 20 : 6 : 11
 3 - acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-
 eau : 60 : 20 : 6 : 11
35 4 - acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-
 eau : 30 : 20 : 6 : 11

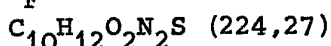
Exemple 1

Dichlorhydrate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-agmatine (dans la formule générale (I), X représente un résidu D-phénylalanine, B un atome de chlore et $n = 2$).

5 Etape 1 : N-benzyloxycarbonyl-S-méthyl-isothiourée

On dissout 13,9 g (0,1 mole) de S-méthyl-isothiourée dans 50 ml d'eau, on refroidit à 0-5°C et à cette température et sous agitation constante, on ajoute en l'espace de 20 minutes environ, 15 ml (0,1 mole) de benzyl-
 10 ester de l'acide chloroformique et 50 ml d'hydroxyde de sodium 4N. Le précipité formé est filtré, lavé à trois reprises avec 50 ml d'eau froide, puis à trois reprises avec 50 ml de n-hexane et enfin séché sous vide sur du pentoxyde de phosphore. Rendement : 15,7 g (70 %) du
 15 produit recherché. P.F. = 74 à 75°C ;

$$R_F^1 = 0,70 \text{ à } 0,75.$$



calculé : C 53,55, H 5,39 N 12,49 S 14,3 %

trouvé : C 53,59, H 5,69 N 12,23 S 14,27 %

20 Etape 2 : N-tert.-butyloxycarbonyl-N^G-benzyloxycarbonyl-agmatine

6,7 g (30 mmoles) de chlorhydrate de 1-(tert.-butyloxycarbonyl)-1,4-diamino-butane [Geiger : Liebig's, Ann. Chem., 750, 165 (1971)] et 6,7 g (30 mmoles) du
 25 dérivé d'isothiourée (exemple 1, étape 1) sont dissous dans 15 ml d'éthanol, 4,2 ml (30 mmoles) de triéthylamine sont ajoutés et la solution est maintenue pendant 3 heures dans un bain de vapeur. Le mélange réactionnel est évaporé, le résidu est dissous dans un mélange de 150 ml
 30 de benzène et 50 ml d'acide acétique 1N, la couche benzénique est lavée avec 10 ml d'eau et évaporée sous pression réduite. Le résidu cristallin est mis en suspension dans 30 à 50 ml de benzène refroidi jusqu'à 10°C, environ, filtré et lavé avec 10 ml de benzène froid, puis avec du n-
 35 hexane. Rendement : 7,9 g (60 %) du composé recherché.
 P.F. = 99 à 101°C ;

$$R_F^1 = 0,60 \text{ à } 0,64$$

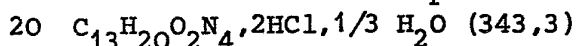


Calculé : C 55,03, H 7,69 N 12,84 %

trouvé : C 55,1 , H 7,8 N 12,65 %

- 5 Etape 3 : Dichlorhydrate de N^G-benzyloxycarbonyl-agmatine (dans la formule générale (II), A représente une fraction Y-HN-C(NH)-, Y un groupe benzyloxy-carbonyle, B un atome de chlore et n = 2)

On met en suspension 5,5 g (15 mmoles) d'agmatine protégée (exemple 1, étape 2), dans 10 ml d'acétate d'éthyle, puis, sous agitation et refroidissement par de la glace, on ajoute 20 ml d'acétate d'éthyle contenant 11 à 15 % d'acide chlorhydrique. On poursuit l'agitation pendant 30 minutes, puis on dilue la suspension avec 10 ml d'acétate d'éthyle, on la filtre, on la lave avec de l'acétate d'éthyle, puis on la sèche sur de l'hydroxyde de potassium à la température ambiante et sous pression réduite. Rendement : 4,2 g (83 %) du produit recherché. P.F. = 150 à 153°C ; $R_F^4 = 0,49 \text{ à } 0,59$.



calculé : C 45,48, H 6,65, N 16,32, Cl 20,65 %

trouvé : C 45,5 , H 6,5 , N 16,3 , Cl 20,3 %

Etape 4 : Benzyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-agmatine

25 On met en suspension 2 g (6 mmoles) de chlorhydrate d'agmatine bloquée (exemple 1, étape 3) dans 10 ml de diméthylformamide, on ajoute 1,5 ml d'eau, puis on ajuste le pH de la solution à 8-9 à l'aide de triéthylamine (environ 1,5 ml). La solution est refroidie à -15°C, puis versée dans l'anhydride mixte suivant : 2,4 g (6 mmoles) de benzyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-proline [Nikolaides et coll. : J. Med. Chem. 11, 74 (1968)] sont dissous dans 12 ml de diméthylformamide, refroidis à -15°C et à cette température et sous agitation, additionnés de 0,66 ml (6 mmoles) de N-méthylmorpholine et de 0,8 ml (6 mmoles) d'isobutylester de

l'acide chloroformique. Après 10 minutes d'agitation, la solution dans le diméthylformamide obtenue ci-dessus est versée dans la solution préparée en premier. Le pH du mélange réactionnel est ajusté, si besoin est, à une valeur comprise entre 8 et 9 à l'aide de triéthylamine. L'agitation est poursuivie pendant une heure à -15°C , puis une heure à 0°C et le mélange réactionnel est évaporé. Le résidu est dissous dans un mélange de 60 ml d'une solution 4:1 de benzène : acétate d'éthyle et de 20 ml d'eau; la couche organique est lavée deux fois avec 20 ml d'eau contenant 1 % de morpholine, deux fois avec 20 ml d'acide chlorhydrique 0,1N et enfin deux fois avec 20 ml d'eau, puis séchée sur du sulfate de sodium et enfin évaporée sous pression réduite. Rendement : 3,1 g (80 %) du composé du titre. $R_F^2 = 0,30$ à $0,35$.

Etape 5 : Dichlorhydrate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-agmatine.

On dissout 3,1 g (4,8 mmoles) de dipeptidyl-agmatine protégée (exemple 1, étape 4) dans 40 ml de méthanol ; on ajoute 4,8 ml d'acide chlorhydrique 2N, puis on soumet le mélange à une hydrogénation sur du charbon palladié. Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 5 ml de méthanol et dilué par 30 à 40 ml d'acétone. Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'acétone et séchés à l'air. Rendement : 2,05 g (95 %) du composé du titre.

P.F. = 216 à 219°C ; R_F^4 0,5 à 0,6 ;

$[\alpha]_D^{20} = -125,5^{\circ}$ ($c = 1$, acide acétique 0,1 N)

30 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_6 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$ (453,4)

Calculé : C 50,32, H 7,26, N 18,53, Cl 15,64 %

trouvé : C 50,8, H 7,5, N 18,3, Cl 15,6 %

Exemple 2

Dichlorhydrate de D-phénylalanyl-L-prolyl-agmatine (dans la formule générale (I), X représente un résidu D-phénylalanine, B un atome de chlore et $n = 2$).

5. Etape 1 : Chlorhydrate de benzyloxycarbonyl-D-phénylalanyl-L-prolyl-agmatine.

On dissout 4 g (10 mmoles) de benzyloxycarbonyl-D-phénylalanyl-L-proline [Nikolaïdes et coll. : J. Med. Chem. 11, 74 (1968)] dans 20 ml de diméthylformamide, on
10 refroidit la solution obtenue à -15°C et à cette température et sous une agitation constante, on y ajoute 1,11 ml (10 mmoles) de N-méthyl-morpholine et 1,32 ml (10 mmoles) d'isobutylester de l'acide chloroformique. L'agitation est poursuivie pendant 10 minutes, puis la solution suivante y
15 est versée : on met en suspension 2,05 g (10 mmoles) de dichlorhydrate d'agmatine (dans la formule (II), A représente un résidu $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})$, B un atome de chlore et $n = 2$) dans 15 ml de diméthylformamide ; 2 ml d'eau, puis on ajoute 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine et le système est
20 refroidi à -15°C . Le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures à -15°C , pendant 1 heure sans refroidissement, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est dissous dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0,2N et extrait à trois reprises avec 20 ml d'acétate d'éthyle.
25 Le pH de la couche aqueuse est ajusté à l'aide de carbonate acide de sodium solide jusqu'à une valeur comprise entre 8,0 et 8,5 et cette phase est extraite à cinq reprises par 20 ml de chloroforme. Les couches chloroformiques réunies sont lavées deux fois avec 10 ml d'eau et évaporées
30 sous pression réduite. Le résidu est repris avec de l'éther diéthylique, filtré, lavé avec de l'éther diéthylique, et séché à l'air. Rendement : 4,1 g (75 %) du composé recherché. $R_F^3 = 0,5$ à 0,6.

Etape 2 : Dichlorhydrate de D-phénylalanyl-L-prolyl-agmatine.

On dissout 3,8 g (7 mmoles) de dipeptidyl-

agmatine bloquée (exemple 2, étape 1) dans 60 ml de méthanol ; on ajoute 3,5 ml d'acide chlorhydrique 2N et on soumet le mélange à une hydrogénation sur du charbon palladié. Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 10 ml de méthanol et dilué par 40 à 60 ml d'acétone. Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'acétone et séchés à l'air. Rendement : 2,95 g (95 %) du produit recherché.

10 P.F. = 216 à 219°C ; R_F^4 : 0,5 à 0,6 ; $[\alpha]_D^{20} = -125,5^\circ$ (c = 1, acide acétique 0,1N).

Exemple 3

Dichlorhydrate de O-benzyl-D-séryl-L-prolyl-agmatine (dans la formule générale (I), X représente un résidu O-benzyl-D-sérine, B un atome de chlore et n = 2).

15 Etape 1 : Dichlorhydrate de L-prolyl-agmatine.

On dissout 3,7 g (10 mmoles) de benzyloxy-carbonyl-L-prolyl-p-nitrophényl ester [Goodman et Stueben : J. Am. Chem. Soc. 81, 3980 (1959)] dans un mélange de 10 ml de diméthylformamide et 5 ml de pyridine ; on y ajoute 2,03 g (10 mmoles) de dichlorhydrate d'agmatine (dans la formule générale (II), A représente un résidu $H_2N-C(NH)-$, B un atome de chlore et n = 2) et 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine et l'on agite pendant 16 à 20 heures. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans un mélange de 50 ml d'acide chlorhydrique 0,1N et de 20 ml d'acétate d'éthyle ; la couche aqueuse est extraite à deux reprises par 20 ml d'éther diéthylique, neutralisée à l'aide de carbonate acide de sodium solide, puis extraite à cinq reprises par chaque fois 20 ml de chloroforme. Les couches chloroformiques sont réunies, puis lavées deux fois avec de l'eau et évaporées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation, qui est le chlorhydrate de benzyloxy-carbonyl-L-prolyl-agmatine ($R_F^3 = 0,32$ à 0,42) est dissous dans 40 ml de méthanol ; 10 ml d'acide chlorhydrique 1N

20

25

30

35

sont ajoutés et le mélange est soumis à une hydrogénation en présence de charbon palladié. Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris par de l'éther diéthylique, filtré, lavé avec de l'éther diéthylique et séché sur de l'hydroxyde de potassium sous pression réduite. Rendement : 2,1 g (70%) du produit recherché. P.F. = 186 à 189°C ;

R_F^4 : 0,15 à 0,25 ; $[\alpha]_D^{20} = -33,25^\circ$ (c = 1, méthanol).

10 $C_{10}H_{21}ON_2,2 HCl$ (300,2)

Calculé : C 40,00, H 7,72, N 23,32, Cl 23,62 %

trouvé : C 40,00, H 7,7, N 23,0, Cl 23,3 %

Etape 2 : Dichlorhydrate de O-benzyl-D-séryl-L-prolyl-agmatine.

15 On met en suspension 1,5 g (5 mmoles) de dichlorhydrate de L-prolyl-agmatine (exemple 3, étape 1) dans 5 ml de diméthylformamide ; on ajoute 0,5 ml d'eau et 0,7 ml (5 mmoles) de triéthylamine ; on refroidit le mélange à -15°C et on le verse dans l'anhydride mixte

20 suivant : on dissout 1,5 g (5 mmoles) de tert.-butyloxy-carbonyl-O-benzyl-D-sérine [Otsuka et coll. : Bull. Chem. Soc. Japon, 39, 1171 (1966)] dans 10 ml de diméthylformamide et on refroidit à -15°C ; à cette température et sous agitation, on ajoute 0,6 ml (5 mmoles) de N-méthyl-

25 morpholine et 0,7 ml (5 mmoles) d'isobutylester de l'acide chloroformique. L'agitation est poursuivie pendant 10 minutes, puis la solution dans le diméthylformamide préparée en premier lieu est ajoutée à la solution ainsi préparée. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure

30 à -15°C, puis pendant une autre heure à 0°C et il est enfin évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans un mélange de 10 ml d'eau et 50 ml de chloroforme ; la couche chloroformique est lavée deux fois avec 10 ml d'eau et deux fois avec 10 ml d'une solution à 5 % de

35 carbonate acide de sodium, puis séchée sur du sulfate de sodium et évaporée sous pression réduite. Le résidu est

- repris par de l'éther diéthylique, filtré, lavé avec de l'éther diéthylique et séché à l'air. Le chlorhydrate de tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-D-séryl-L-prolyl-agmatine résultant ($R_F^3 = 0,4$ à $0,5$) est mis en suspension
- 5 dans 5 ml d'acétate d'éthyle et sous une agitation constante et refroidissement par de la glace, on lui ajoute 10 ml d'acétate d'éthyle contenant 11 à 15 % d'acide chlorhydrique. Après 30 minutes d'agitation, la suspension est filtrée, lavée à l'acétate d'éthyle et séchée sur de
- 10 l'hydroxyde de potassium sous pression réduite. Le produit est dissous dans 20 ml d'eau et lyophilisé. Rendement : 1,62 g (65 %) du produit recherché. P.F. = 110 à 115°C ; $R_F^4 : 0,56$ à $0,66$; $[\alpha]_D^{20} = -47^\circ$ ($c = 1$, acide acétique 0,1N).
- 15 $C_{20}H_{32}O_3N_6,2 HCl, H_2O$ (495,45)
 Calculé : C 48,48, H 7,32, N 16,96, Cl 14,31 %
 trouvé : C 48,4 , H 7,4 , N 16,85, Cl 14,3 %

Exemple 4

- Dichlorhydrate de D-phénylglycyl-L-prolyl-
- 20 agmatine (dans la formule générale (I), X représente un résidu D-phénylglycine, B un atome de chlore et $n = 2$).
- Etape 1 : Acétate de 1-amidino-3,5-diméthyl-pyrazole.
- On dissout 20,1 g (100 mmoles) de nitrate de 1-amidino-3,5-diméthyl-pyrazole [Thiele et Dralle : Ann.,
- 25 302, 294 (1898)] dans 200 ml de chlorure de méthylène et 110 ml d'hydroxyde de sodium 1N. La couche aqueuse est extraite à deux reprises par 50 ml de chlorure de méthylène les solutions dans le chlorure de méthylène sont réunies, séchées sur du sulfate de sodium, acidifiées par de l'aci-
- 30 de acétique (environ 6 ml) et évaporées sous pression réduite. Le résidu cristallin obtenu est mis en suspension dans de l'éther diéthylique, filtré, lavé par de l'éther diéthylique et séché à l'air. Rendement : 18,25 g (92 %) du produit du titre. P.F. = 114 à 116°C.

$C_6H_{10}N_4, CH_3COOH$ (198,2)

Calculé : C 48,47, H 7,12, N 28,27 %

trouvé : C 48,6, H 7,1, N 28,5 %

Etape 2 : Dichlorhydrate de L-prolyl-agmatine.

- 5 On met en suspension 4,2 g (10 mmoles) de benzyloxycarbonyl-L-prolyl-4-(tert.-butyloxycarbonylamido)-butylamine [Fuchs et coll. : Liebigs Ann. Chem. 1977, 602] dans 10 ml d'acétate d'éthyle, puis sous agitation constante et refroidissement par la glace, on ajoute 20 ml
- 10 d'acétate d'éthyle contenant 11 à 15 % d'acide chlorhydrique. Après 30 minutes d'agitation, la suspension est filtrée, lavée à l'acétate d'éthyle et séchée sur de l'hydroxyde de potassium sous pression réduite. Le produit résultant ($R_F^3 = 0,24$ à $0,34$) est dissous dans 10 ml d'éthanol ; on
- 15 lui ajoute 2 g (10 mmoles) d'acétate de 1-amidino-3,5-diméthyl-pyrazole (exemple 4, étape 1) et 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine, puis on maintient le mélange réactionnel pendant 3 heures sur un bain de vapeur. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite, reprise
- 20 par de l'acétate d'éthyle, filtrée et lavée à l'acétate d'éthyle et à l'éther diéthylique. Le chlorhydrate de benzyloxycarbonyl-L-prolyl-agmatine résultant ($R_F^3 = 0,3$ à $0,4$) est dissous dans 40 ml de méthanol, additionné de 10 ml d'acide chlorhydrique 1N et le mélange est soumis
- 25 à une hydrogénation en présence de charbon palladié. Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris par de l'éther diéthylique, les cristaux formés sont filtrés, lavés avec
- 30 de l'éther diéthylique et séchés à l'air. Rendement : 1,81 g (60 %) de dichlorhydrate de L-prolyl-agmatine. P.F. = 186 à 189°C ; $R_F^4 = 0,15$ à $0,25$.

Etape 3 : Dichlorhydrate de D-phénylglycyl-L-prolyl-agmatine.

- 35 On convertit 1,43 g (5 mmoles) de benzyloxycarbonyl-D-phénylglycine [Wissmann et coll. : Z. Physiol.

- Chem. 355, 1083 (1974)] en un anhydride mixte que l'on fait réagir avec 1,5 g (5 mmoles) de dichlorhydrate de L-prolyl-agmatine (exemple 3, étape 1 ou exemple 4, étape 2) selon la procédure qui est décrite dans l'exemple 3, étape 2. Le
- 5 chlorhydrate de benzyloxycarbonyl-D-phénylglycyl-L-prolyl-agmatine, obtenu par traitement du mélange réactionnel ($R_F^3 = 0,28$ à $0,34$), est dissous dans 30 ml de méthanol ; on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique 1N, puis on soumet le mélange à une hydrogénation en présence de charbon palladié.
- 10 Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éther, filtré, lavé à l'éther diéthylique et séché sur de l'hydroxyde de potassium, sous pression réduite. Rendement : 1,62 g (75 %) du
- 15 produit recherché. $R_F^3 = 0,1$ à $0,2$; $R_F^4 = 0,43$ à $0,50$; $[\alpha]_D^{20} = -94^\circ$ (c = 1 dans de l'acide acétique 0,1N).

- Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent
- 20 d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Nouveaux dérivés de l'agmatine et leurs sels, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale (I) ci-après :

5 X-Pro-Agm, (HB)_n (I)

dans laquelle :

X représente une fraction d' α -amino acide de configuration D, comprenant une chaîne latérale alkyle inférieur contenant un groupe phényle, phényl-
10 alkyle inférieur ou phényl-hétéroatome

Pro représente un résidu L-proline,

Agm représente un groupe agmatine,

B représente un résidu d'acide et

n est égal à 0, 1 ou 2.

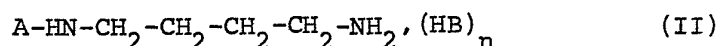
15 2°) Nouvelle dipeptidyl-agmatine selon la Revendication 1, caractérisée en ce que la chaîne latérale portée par le N terminal de la fraction D- α -amino acide est un groupe phényl-alkyle inférieur et notamment la D-phényl-alanyl-L-prolyl-agmatine, (HB)_n.

20 3°) Nouvelles préparations pharmaceutiques utilisées principalement en tant qu'anticoagulants, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs composés représentés par la formule générale (I) selon la Revendication 1, dans laquelle X, Pro, Agm, B et n sont tels que
25 définis dans la Revendication 1, conjointement avec des supports et des agents auxiliaires convenables, sous forme de compositions pharmaceutiques formulées pour être injectées, ou préparées sous forme de comprimés enrobés ou non et de capsules.

30 4°) Nouvelles préparations pharmaceutiques utilisées principalement en tant qu'anticoagulants, caractérisées en ce qu'elles renferment un ou plusieurs composés de formule générale (I) selon la Revendication 1, dans laquelle X, Pro, Agm, B et n sont tels que définis dans la
35 Revendication 1, associés à 50 à 100 unités d'héparine de qualité pharmaceutique pour 1 mg de peptide, ainsi qu'à

des supports pharmaceutiques.

5°) Procédé de préparation de nouveaux dérivés de l'agmatine et de leurs sels de formule générale (I) selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'on condense un dérivé 1,4-diamino-butane représenté par la formule générale (II) ci-après :



dans laquelle :

- A représente une fraction $H_2N-C(NH)-$, $Y-HN-C(NH)-$ ou Q,
- Y et Q représentent des groupes protecteurs du radical amine généralement utilisés dans la chimie des peptides,
- B est un résidu d'acide et
- 15 n est égal à 0, 1 ou 2,
- avec une L-proline dont le radical amine est bloqué et ensuite progressivement avec l'acide aminé suivant ou avec un L-proline peptide quelconque selon des méthodes connues en chimie des peptides, en ce qu'on sépare éventuellement le groupe protecteur Q de la partie 1,4-diamino-butane du composé ainsi préparé, en ce qu'on convertit le groupe amine ainsi libéré en groupe guanidino- selon des méthodes connues, puis en ce qu'on élimine de la dipeptidyl-agmatine résultante à la fois le groupe protecteur du radical amino terminal et éventuellement le groupe de blocage Y de la partie guanidino et en ce qu'on isole la dipeptidyl-agmatine libre sous la forme d'un sel.