

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149630 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1163/80

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/08

(22) Indleveringsdag: 18 mar 1980

(24) Løbedag: 16 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 18 mar 1980

(44) Fremlagt: 18 aug 1986

(86) International ansøgning nr.: PCT/SE79/00157

(86) International indleveringsdag: 16 jul 1979

(85) Videreførelsesdag: 18 mar 1980

(30) Prioritet: 18 jul 1978 SE 7807937

(71) Ansøger: AB *KABI; Stockholm, SE.

(72) Opfinder: Karl Goeran *Claeson; SE, Leif Roger *Simonsson; SE, Salo *Arielly; SE.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af tripeptidamider eller -estere eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte deraf

(57) Sammendrag:

1163-80

Tripeptidforbindelser med formlen

$H-D-X-Phe-Arg-Y$

hvor

X udvælges fra gruppen bestående af Pro og Phe,

Y udvælges fra gruppen bestående af $O-R_1$, $NH-R_2$,

hvor:

R_1 udvælges fra gruppen bestående af lige, forgrenede og cykliske alkylgrupper med 1-12 carbonatomer, og

R_2 udvælges fra gruppen bestående af H, lige, forgrenede eller cykliske alkylgrupper med 1-12 carbonatomer, og fysiologisk acceptable salte heraf.

Fremgangsmåde til fremstilling af tripeptidforbindelserne ved syntese- og rensningsmetoder som er kendte indenfor peptidkemien.

Farmaceutiske præparater omfattende tripeptidforbindelserne.

DK 149630 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte bradykininhæmmende tripeptidamider eller -estere eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte deraf.

Proteolytiske enzymer's, navnlig kallikrein's indvirkning på plasmaproteinet kininogen frigiver nonapeptidet bradykinin med formlen:



Bradykinin (BK) udviser stærk farmakodynamisk aktivitet. I ekstremt lave doser bevirker BK også vasodilation, indsnævring af bronkierne, permeabilitetsforøgelse i kapillærkarrene, smerte ved påvirkning af nerveenderne, kontraktion eller relaksation af extravasale glatte muskler, f.eks. i tarme og uterus, akkumulering af leucocyter.

De mekanismer, hvorved bradykinin er aktiv, kendes kun ufuldstændigt, men der er sandsynligvis flere forskellige receptorer på de forskellige målorganer. Nogle af BK's virkninger kan sandsynligvis også formidles ved frigørelse af andre aktive forbindelser, såsom prostaglandiner.

BK er sandsynligvis involveret ved en række forskellige sygdomme, f.eks. ved inflammatoriske processer, chok af forskellige årsager, reumatoid arthritis, gigt, pancreatitis, carcinoid, migræne, arvelig angioneurotisk ødem, forbrændinger, allergier.

Det er sandsynligt, at behandling med en passende antagonist mod BK ville være fordelagtig for de sygdomme, hvor BK-niveauet forøges.

I mange år har videnskabsmænd søgt efter specifikke BK-hæmmere, men imidlertid uden held på trods af, at der er syntetiseret et meget stort antal BK-fragmenter og -analoger.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af tripeptidamider eller -estere med den almene formel:



hvor X betegner Pro eller Phe, og Y betegner O-R_1 eller NH-R_2 , hvor R_1 betegner en lige eller forgrenet alkylgruppe med 1-12 carbonatomer, og R_2 betegner H eller en lige, forgrenet eller cyklisk alkylgrup-

pe med 1-12 carbonatomer eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte heraf, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at de i peptidet indeholdte aminosyrer i vilkårlig rækkefølge og på inden for peptidkemien sædvanlig måde kondenseres til dannelse af et peptid med den ønskede aminosyresekvens, hvorefter eventuelle beskyttelsesgrupper fraspaltes, og det opnåede peptid om ønsket overføres i et syreadditionssalt deraf. Det har vist sig, at de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede tripeptidforbindelser giver specifik hæmning af bradykinin.

Til syntese af de hidtil ukendte BK-antagonister anvendes traditionelle, indenfor peptidkemifagområdet velkendte metoder med beskyttende grupper og kobling. De C-terminale ester- eller amidgrupper kobles ligeledes ved syntesemetoder, der er velkendte indenfor organisk kemi. Rensningen af mellem- og slutprodukter udføres ved præcipitation, omkrystallisation eller gelkromatografisk separation.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres af de efterfølgende eksempler.

Forkortelser.

Aminosyrer (med mindre andet angives menes L-konfiguration).

Arg	=	arginin
Phe	=	phenylalanin
Pro	=	prolin

Andre

AcOH	=	eddikesyre
Boc	=	t-butyloxycarbonyl
Cbo	=	carbobozy
DCCI	=	dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	dimethylformamid
DMSO	=	dimethylsulfoxid
Et ₃ N	=	triethylamin
EtOAc	=	ethylacetat
EtOH	=	ethanol
H ₂ O	=	destilleret vand
HBT	=	N-hydroxybenzotriazol
MeOH	=	methanol
OpNP	=	p-nitrophenoxy
i-PrOH	=	isopropylalkohol
TFA	=	trifluoreddikesyre
TLC	=	tyndtlagskromatografi

Tyndtlagskromatografi

Til TLC-analyserne anvendes færdigt fremstillede glasplader med silicagel "F₂₅₄"(Merck) som absorbens. Der anvendes følgende solvent-systemer (volumenforhold):

5

A = n-butanol:AcOH:vand (3:2:1)

P₁ = chloroform:MeOH (9:1)

Pa = chloroform:MeOH:AcOH (17:2:2)

Pa₆ = chloroform:MeOH:AcOH:H₂O (34:4:9:2)

10

M = n-butanol:AcOH:H₂O:pyridin (30:6:24:20)

Når kromatografien er færdig, undersøges pladen i UV-lys (254 nm), og den fremkaldes med chlor/-o-toluidinreagens ifølge den traditionelle metode. De anførte R_f-værdier er resultatet af separate kromatografibehandlinger.

15

EKSEMPEL I

H-D-Pro-Phe-Arg-O-heptyl·2HCl.

M.w. (molekylvægt) = 589,6.

20 Ia. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-OMe. M.w. = 514,5.

27g (0,10 mol) H-Arg(NO₂)-OMe·HCl opløst i 4 ml DMF neutraliseres, når det er afkølet, med 18 ml Et₃N. Det dannede Et₃NHCl fjernes ved filtrering, og derefter tilsættes 42g (0,105 mol) Cbo-Phe-OpNP. Reaktionen får lov til at fortsætte natten over, og derefter inddampes reaktionsblandingen under vakuum til en olie, som opløses i 500 ml EtOAc. EtOAc-fasen vaskes i rækkefølge med 2% NaHCO₃ i H₂O, H₂O, HCl fortyndet med H₂O og H₂O. Efter tørring med Na₂SO₄ inddampes EtOAc-fasen til ca. 200 ml og præcipiteres ved tilsætning af ether. Det krystallinske præcipitat vaskes med ether og tørres. Ifølge TLC er det rent.

25

Udbytte: 37,6g (73%) Ia

TLC: R_f = 0,52 (P1)

30 Ib. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-OH. M.w. = 500,5.

35 3,1 g (6,0 mmol) Ia opløses i ca. 150 ml MeOH, og derefter tilsættes 7,3 mmol (7,3 ml/l M NaOH i H₂O). Efter ca. 4 timer inddampes reaktionsblandingen under vakuum, opløses i et lille volumen H₂O og vaskes to gange med EtOAc. H₂O-Fasen gøres sur med HCl til pH = 2, og det derefter dannede Cbo-Phe-Arg(NO₂)-OH ekstraheres med EtOAc (3

gange). EtOAc-fasen vaskes med 10% NaCl i H_2O , tørres med Na_2SO_4 og indampes til tørhed. Efter udvaskning med ether tørres de dannede krystaller. Ifølge TLC er produktet rent.

Udbytte: 2,86g (95%) Ib

5 TLC: $R_f = 0,14$ (Pa).

Ic. Cbo-Phe-Arg(NO_2)-O-heptyl. M.w. = 598,7.

0,60 ml $SOCl_2$ (destilleret) tilsættes til 10 ml 1-heptanol under fugtfrie betingelser og med køling i et isbad. Efter omrøring i 1 time ved
10 stuetemperatur tilsættes 1,00g (2,0 mmol) Ib. Reaktionen er afsluttet efter en time, og reaktionsblandingen er da en tyk, hvid masse. Reaktionsblandingen fortyndes med ether, og de resulterende, tunge krystaller filtreres fra. Krystalmassen opløses i MeOH og præcipiteres med H_2O (fjerner dannet HCl). De opnåede krystaller filtreres fra.
15 viser fuldstændigt rent heptylester.

Udbytte: 962 mg (80%) Ic.

TLC: $R_f = 0,60$ (P1).

Id. Boc-D-Pro-Phe-Arg(NO_2)-O-heptyl. M.w. = 661,8.

20 600 mg (1,0 mmol) Ic opløses i 2ml HOAc, og der tilsættes 1,4 ml 5,6M HBr i HOAc. Reaktionsblandingen hældes derefter ud i ca. 100 ml tør ether. Det dannede præcipitat filtreres fra og vaskes med tør ether og tørres under vakuum over NaOH. Det opnåede HBr-salt af H-Phe-Arg(NO_2)-O-heptyl opløses i 2 ml DMF og neutraliseres ved lav
25 temperatur ($-10^{\circ}C$) med Et_3N indtil basisk reaktion. Det opnåede $Et_3N \cdot Br$ filtreres fra. Til reaktionsblandingen tilsættes 215 mg (1,0 mmol) Boc-D-Pro-OH og 135 mg (1,0 mmol) HBT og ved lav temperatur 250mg (ca. 1,2 mmol) DCCl. Reaktionen får lov til at fortsætte natten over, og det fremkomne DCU filtreres fra (efter afkøling), og reaktionsblandingen indampes under vakuum til en olie. Olien æltes med en
30 lille mængde 2% $NaHCO_3$ i H_2O . Den opnåede masse opløses i en lille mængde MeOH og kromatograferes på en søjle med Sephadex[®] LH-20 i MeOH med MeOH som et elueringsmiddel. Den fraktion, der består af rent Id, opløses med vand, og MeOH afdampes under vakuum.
35 præcipiteres som et tungt pulver, som genvindes og tørres under vakuum.

Udbytte: 570 mg(86%) Id

TLC: $R_f = 0,65$ (Pa), 0,52 (P1).

I. H-D-Pro-Phe-Arg-O-heptyl·2HCl. M.w. = 589,6.

Fra 400 mg (0,6 mmol) Id fjernes beskyttelsen med 30 ml HF ved 0°C i en time i nærværelse af 0,4 ml anisol. Efter inddampning under vakuum opløses produktet i 20ml 2% HOAc i H₂O og vaskes flere gange med en lille mængde ether. H₂O-Fasen kromatograferes på en søjle med Sephadex® G-15 i 2% HOAc med det samme medium til eluering. Den fraktion, der indeholder det let kontaminerede acetat af I, frysetørres og ionbyttes på en søjle med "QAE-25" (Pharmacia Fine Chemicals) i chloridform i 50% EtOH-50% H₂O med det samme medium til eluering. Der opnås en fraktion med fuldstændigt rent I.

Udbytte: 318 mg (89%) I

TLC: R_f = 0,27 (A) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00, Phe 1,02, Pro 0,99.

Eksempel II

H-D-Pro-Phe-Arg-NH-heptyl·2HCl. M.w. = 588,6.

Ila. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-NH-heptyl. M.w. = 597,7.

1,0 g (2,0 mmol) Cbo-Phe-Arg(NO₂)-OH (Ib) og 0,27 mg (2,0 mmol) HBT opløses i 5,0 ml DMF, og derefter tilsættes 0,50 g (ca. 2,4 mmol) DCCI med afkøling i et isbad. Efter ca. 1 time tilsættes 0,33 ml (2,2 mmol) heptylamin. Reaktionen får lov til at fortsætte med omrøring natten over, og derefter filtreres det dannede DCU fra, og reaktionsblandingen inddampes under vakuum til en olie. Olien æltes med H₂O, 2% NaHCO₃, H₂O, 2% KHSO₄, og endeligt med H₂O. Den opnåede masse krystalliseres fra MeOH + H₂O. TLC viser et mindre biprodukt R_f = 0,54 (Pa) sammen med hovedproduktet R_f = 0,58 (Pa). Udbytte: 1,13g (94%) Ila.

IIb. Boc-D-Pro-Phe-Arg(NO₂)-NH-heptyl. M.w. = 660,8.

For 1,0g (1,67 mmol) Ila fjernes beskyttelsen med 4 ml HOAc og 2,8 ml HBr på samme måde som Ic i eksempel I. TLC af HBr-saltet af H-Phe-Arg(NO₂)-NH-heptyl er kontamineret med en mindre mængde af et biprodukt R_f = 0,72 (Pa₆) sammen med hovedproduktet. R_f = 0,61 (Pa₆). HBr-saltet ionbyttes på en søjle med QAE-25 i chloridform i 90% EtOH-10% H₂O med samme medium til eluering. Der opnås en fraktion med rent hovedprodukt i chloridform, 496 mg (1,0 mmol), som opløses i 2 ml DMF og neutraliseres med 0,15 ml Et₃N. Derefter tilsættes 215 mg

(1,0 mmol) Boc-D-Pro-OH, 135 mg (1,0 mmol) HBT og under kølige betingelser 250 mg (ca. 1,2 mmol) DCCl. Reaktionen afsluttes efter 20 timer, og derefter filtreres reaktionsblandingen og inddampes under vakuum til en olie, som æltes med 2% NaHCO₃ i H₂O og H₂O. Den opnåede masse opløses i MeOH og kromatograferes på en søjle med Sephadex[®] LH-20 i MeOH med MeOH som elueringsmiddel. Fraktionen med

5 rent IIb inddampes under vakuum og udvaskes med H₂O. Den opnåede krystalmasse tørres under vakuum.

Udbytte: 457 mg (69%) IIb

10 TLC: R_f = 0,35 (P1).

II. H-D-Pro-Phe-Arg-NH-heptyl·2HCl. M.w. = 588,6.

Fra 300 mg IIb fjernes beskyttelsen på samme måde som i Id i eksempel

I. Yderligere rensning udføres på samme måde som i eksempel I.

15 Udbytte: 263 mg (98%) II.

TLC: R_f = 0,25 (A) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00, Phe 0,97, Pro 0,98.

20 Eksempel III.

H-D-Pro-Phe-Arg-NH₂·2HCl. M.w. = 490,5.

IIIa. Boc-D-Pro-Phe-OMe. M.w. = 376,4.

4,2g (19,5 mmol) Boc-D-Pro-OH og 2,7 g (20,0 mmol) HBT opløses i 50

25 ml DMSO. Under omrøring og under kølige betingelser tilsættes 4,4 g (ca. 21 mmol) DCCl. Til reaktionsblandingen tilsættes en opløsning af 4,3 g (20,0 mmol) H-Phe-OMe-HCl i 50 ml DMF, som tidligere under kølige betingelser er neutraliseret med 2,8 ml (20,0 mmol) Et₃N og derefter filtreret. Reaktionen får lov til at fortsætte natten over, og

30 derefter frafiltreres det dannede DCU. Reaktionsblandingen inddampes under vakuum til en olie, som opløses i 300 ml EtOAc. EtOAc-opløsningen vaskes i rækkefølge med 2% NaHCO₃ i H₂O, H₂O, 2% KHSO₄ i H₂O og endelig H₂O, og tørres derefter med Na₂SO₄. EtOAc-opløsningen inddampes under vakuum til tørhed, og den opnåede krystal-

35 masse behandles med petroleumsether, filtreres og vaskes med petroleumsether. Krystalmassen tørres under vakuum.

Udbytte: 5,5 g (75%) IIIa

TLC: R_f = 0,53 (P1).

IIIb. Boc-D-Pro-Phe-OH. M.w. = 362,4.

4,5 g (12,0 mmol) IIIa opløses i 50 ml MeOH, og der tilsættes 15 ml 1N NaOH (15 mmol). Efter 2 til 3 timers omrøring ved stuetemperatur udføres inddampning til tørhed. Den opnåede masse opløses i 100 ml H₂O og vaskes to gange med 50ml ether, og derefter gøres den vandige fase sur med KHSO₄ til pH = 3. Efter omrøring ved 0°C i 30 minutter filtreres det dannede præcipitat og vaskes med en lille mængde koldt vand. Præcipitatet tørres derefter under vakuum.

Udbytte: 3,2 g (74%) IIIb

10 TLC: R_f = 0,81 (Pa₆).

IIIc. Boc-D-Pro-Phe-Arg(NO₂)-NH₂. M.w. = 562,6.

0,65 g (1,8 mmol) IIIb og 0,26 g (1,9 mmol) HBT opløses i 10 ml DMF. Under omrøring og kølige betingelser tilsættes 0,38 g (ca. 1,8 mmol) DCCl. Til reaktionsblandingen tilsættes en opløsning af 0,6 g (2 mmol) H-Arg(NO₂)-NH₂·HBr i 10 ml DMF (må opvarmes og afkøles igen før neutralisering), som først neutraliseres under kølige betingelser med 0,3 ml (2,2 mmol) Et₃N og derefter filtreres. Reaktionen får lov til at fortsætte natten over, og derefter filtreres det dannede DCU fra. Reaktionsblandingen inddampes under vakuum til en olie, som opløses i kogende EtOAc (100 ml). Ved afkøling opnås et præcipitat, og det vaskes med EtOAc og ether. Præcipitatet (ca. 0,5g) opløses i en større mængde EtOAc og vaskes i rækkefølge med 2% NaHCO₃, H₂O, H₂O, 2% KHSO₄ og endelig H₂O. EtOAc-opløsningen tørres med Na₂SO₄ og inddampes derefter under vakuum til tørhed.

Udbytte: 480 mg (48%) IIIc.

TLC: R_f = 0,73 (Pa₆).

III. H-D-Pro-Phe-Arg-NH₂·2HCl. M.w. = 490,5.

30 Fra 160 mg (0,28 mmol) IIIc fjernes beskyttelsen med ca. 10 ml HF ved 0°C i 50 minutter i nærværelse af 0,3 ml anisol. Efter inddampning under vakuum opløses substansen i ca. 6 ml 50% EtOH-50% H₂O og ionbyttes på en søjle, der indeholder "QAE-25" i chloridformen i 50% EtOH-50% H₂O med det samme medium til eluering. Fraktionen med III inddampes under vakuum, opløses i ca. 5 ml MeOH og kromatograferes på en søjle med Sephadex[®] LH-20 i MeOH med MeOH som medium til eluering. Fraktionen med rent III frysetørres.

Udbytte: 100 mg (71%) III

TLC : $R_f = 0,34$ (M) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00 , Phe 1,01, Pro 0,98.

5 Eksempel IV

H-D-Pro-Phe-Arg-O-i-Pr $\cdot$ 2HCl. M.w. = 533,5.

IVa. H-Arg(NO₂)-O-i-Pr $\cdot$ HCl. M.w. = 297,8.

- 10 5,5g (25 mmol) Arg(NO₂) opløses i 250 ml isopropanol, og forestring opnås derefter ved gentagne behandlinger med tør HCl-gas på sædvanlig måde. Når reaktionen skønnes at være afsluttet, inddampes reaktionsblandingen til tørhed under vakuum. Esteren (IVa) opnås ved krystallisering ved opløsning af den inddampede masse i en lille mængde varm isopropanol og derefter udfældning med tør ether, når solventen
- 15 har kølet af. De indvundne krystaller vaskes 3 gange med tør ether. Udbytte: 5,8 g (78%) IVa
Smeltepunkt: 179-181°C.

IVb. Boc-D-Pro-Phe-Arg(NO₂)-O-i-Pr. M.w. = 605,7.

- 20 Fremgangsmåde, reagenser og mængder er de samme som i eksempel IIIC, men der anvendes 0,60 g (2,0 mmol) IVa i stedet for H-Arg(NO₂)-NH₂ $\cdot$ HBr.
Udbytte: 440 mg (40%) IVb
TLC: $R_f = 0,41$ (P1).

25

IV. H-D-Pro-Phe-Arg-O-i-Pr. M.w. = 533,5.

Fra 300 mg (0,50 mmol) IVb fjernes beskyttelsen med HF i nærværelse af anisol på samme måde som i eksempel I. Produktet renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

- 30 Udbytte: 180 mg (68%) IV
TLC: $R_f = 0,21$ (A) viser kun en plet.
Aminosyreanalyse:
Arg 1,00, Phe 1,00, Pro 0,98.

35 Eksempel V.

H-D-Phe-Phe-Arg-NH₂ $\cdot$ 2HCl. M.w. = 540,5.

Va. Cbo-D-Phe-Phe-OMe. M.w. = 460,5.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIIa, men med

6,0 g (20 mmol) Cbo-D-Phe-OH i stedet for Boc-D-Pro-OH.

Udbytte: 6,2 g (67%) Va

TLC: $R_f = 0,60$ (P1).

5 Vb. Cbo-D-Phe-Phe-OH M.w. = 446,5.

6,0 g (13,0 mmol) Va hydrolyseres med NaOH på nøjagtig samme måde som i eksempel IIb.

Udbytte: 4,9 g (84%) Vb

TLC: $R_f = 0,85$ (Pa₆).

10

Vc. Cbo-D-Phe-Phe-Arg(NO₂)-NH₂. M.w. = 646,7.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIc, men med 0,89 g (2,0 mmol) Vb i stedet for IIb.

Udbytte: 505mg (39%) Vc

15 TLC: $R_f = 0,80$ (Pa₆).

V. H-D-Phe-Phe-Arg-NH₂·2HCl. M.w. = 540,5.

Fra 400 mg (0,62 mmol) Vc fjernes beskyttelsen, og dette produkt renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

20 Udbytte: 296 g (88%) V.

TLC: $R_f = 0,37$ (M) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00, Phe 1,97.

25 Eksempel VI

H-D-Phe-Phe-Arg-NH-heptyl·2HCl. M.w. = 638,7.

Vla. Cbo-D-Phe-Phe-Arg(NO₂)-NH-heptyl. M.w. = 744,9.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIb, men med

30 Cbo-D-Phe-OH i stedet Boc-D-Pro-OH.

Udbytte: 470 mg (63%) Vla.

TLC: $R_f = 0,42$ (P1).

VI. H-D-Phe-Phe-Arg-NH-heptyl·2HCl. M.w. = 638,7.

35 De beskyttende grupper fjernes fra 300 mg (0,40 mmol) Vla, dette produkt renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

Udbytte: 176 mg (59%) VI

TLC: $R_f = 0,28$ (A) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00, Phe 1,98.

Eksempel VII.

H-D-Pro-Phe-Arg-NH-lauryl·2HCl. M.w. = 658,7

VIIa. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-NH-lauryl. M.w. = 667,8.

- 5 Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIa, men med 0,41g (2,2 mmol) laurylamin som amin i stedet for heptylamin.

Udbytte: 1,17 g (88%) VIIa

TLC: R_f = 0,60 (Pa) er homogen.

- 10 VIIb. Boc-D-Pro-Phe-Arg(NO₂)-NH-lauryl. M.w. = 730,9.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIb, men med 0,67g (1,0 mmol) VIIa som udgangspeptid i stedet for 1,67 mmol IIa i eksempel IIb. Ydermere kan HBr-saltet af H-Phe-Arg(NO₂)-NH-lauryl anvendes uden yderligere rensning på ionbytteren.

- 15 Udbytte: 585 mg (80%) VIIb

TLC: R_f = 0,39 (P1).

VII. H-D-Pro-Phe-Arg-NH-lauryl·2HCl. M.w. = 658,7.

- 20 Fra 300 mg (0,41 mmol) VIIb fjernes beskyttelsen, dette produkt renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

Udbytte: 230 mg (85%) VII.

TLC: R_f = 0,27 (A) viser kun en plet.

Aminosyreanalyser:

Arg 1,00, Phe 0,98, Pro 0,99.

25

Eksempel VIII

H-D-Phe-Phe-Arg-NH-i-Pr·2HCl. M.w. = 582,6.

VIIIa. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-NH-i-Pr. M.w. = 541,6.

- 30 Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIa, men med 130 mg (2,2 mmol) isopropylamin som amin i stedet for heptylamin.

Udbytte: 0,95 mg (88%) VIIIa.

TLC: R_f = 0,51 (Pa) viser en plet.

- 35 VIIIb. Cbo-D-Phe-Phe-Arg(NO₂)-NH-i-Pr. M.w. = 688,8.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel VIa, men med 0,54 g (1,0 mmol) VIIIa som beskyttet dipeptid i stedet for IIa.

Udbytte: 470mg (68%) VIIIb.

TLC: R_f = 0,38 (P1)

VIII. H-D-Phe-Phe-Arg-NH-i-Pr $\cdot$ 2HCl. M.w. = 582,6.

Fra 300 mg (0,44 mmol) VIIIb fjernes beskyttelsen, dette produkt renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

Udbytte: 205mg (80%) VIII

5 TLC: $R_f = 0,23$ (A) viser kun en plet.

Aminosyreanalyse:

Arg 1,00, Phe 1,97.

Eksempel IX.

10 H-D-Phe-Phe-Arg-NH-cyclohexyl $\cdot$ 2HCl. M.w. = 622,7

IXa. Cbo-Phe-Arg(NO₂)-NH-cyclohexyl. M.w. = 581,7.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel IIa, men med 218mg (2,2 mmol) cyclohexylamin som amin i stedet for heptylamin.

15 Udbytte: 0,90g (77%) IXa

TLC: $R_f = 0,60$ (Pa) viser en plet.

IXb. Cbo-D-Phe-Phe-Arg(NO₂)-NH-cyclohexyl. M.w. = 728,8.

Fremgangsmåde, reagenser og mængder som i eksempel VIa, men med 0,58g (1,0 mmol) IXa som beskyttet dipeptid i stedet for IIa.

20 Udbytte: 520mg (71%) IXb

TLC: $R_f = 0,49$ (P1).

IX. H-D-Phe-Phe-Arg-NH-cyclohexyl $\cdot$ 2HCl. M.w. = 622,7.

25 Fra 300 mg (0,41 mmol) IXb fjernes beskyttelsen, dette produkt renses og ionbyttes på samme måde som i eksempel I.

Udbytte: 185mg (72%) IX.

TLC: $R_f = 0,28$ (A)

Aminosyreanalyser:

30 Arg 1,00, Phe 1,96.

De hidtil ukendte tripeptidforbindelsers bradykininhæmmende aktivitet fremgår af følgende omtale af den biologiske evaluering på isolerede organer. Den bradykininhæmmende aktivitet undersøges på isoleret
35 rottelivmoder. Rotterne forbehandles subkutan med 0,2 mg/kg diethylstilbestrol, 12-15 timer før forsøget. Musklen fra livmoderen, som deles på langs i to halvdele, anbringes i et bad for glat muskulatur med de Jalon's buffer (de Jalon et al., Farmacother. Acta, Vol. 3, p. 313, 1945), oxygenet med carbogengas (5% carbondioxyd, 95% oxygen).

Temperaturen holdes på 35°C. Musklen strækkes med træk svarende til 0,5 g. Det isometriske træk måles med en "Grass" (FT 03C) kraft-transmitter, der er forbundet med en "Grass" polygraf.

- 5 Muskelkontraktioner som er fremkaldt af bradykinin i badkoncentrationer på 10^{-11} til 10^{-6} M (mol/liter), registreres, og derefter evalueres den koncentration af bradykinin, som inducerer 70% maximal muskelkontraktion (ED_{70}). Den bradykininhæmmende aktivitet undersøges derefter med tripeptidforbindelserne i badkoncentrationer på 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} og 10^{-5} M mod ED_{70} for bradykinin for den pågældende
- 10 muskel. For hver koncentration inkuberes tripeptidforbindelserne med livmodervævet 5 henholdsvis 10 minutter før tilsætningen af bradykinin. Den bradykininhæmmende aktivitet udtrykkes som den tid i minutter, der kræves, indtil bradykinin igen giver den oprindelige kontraktion. Hver bradykinintilsætning efterfølges af vask med bufferen.

35	30	25	20	15	10	5
Bradykininhæmmende tripeptidforbindelse	lfølge eksempel nr.	Konc. i prøve- bad mol/liter	Hæmning af bra- dykinineffekt, %	Varighed af hæmning, min.		
H-D-Pro-Phe-Arg-O-heptyl	I	10^{-8}	10	15		
		10^{-7}	10	15		
		10^{-6}	100	15		
		10^{-5}	100	35		
H-D-Pro-Phe-Arg-NH-heptyl	II	10^{-8}	15	15		
		10^{-7}	15	20		
		10^{-6}	100	30		
		10^{-5}	100	45		
H-D-Pro-Phe-Arg-NH ₂	III	10^{-8}	15	15		
		10^{-7}	15	15		
		10^{-6}	100	30		
		10^{-5}	100	50		
H-D-Pro-Phe-Arg-OiPr	IV	10^{-7}	10	5		
		10^{-6}	20	5		
		10^{-5}	50	5		

TABEL

TABEL (fortsat)

Bradykininhæmmende tripeptidforbindelse	Ifølge eksempel nr.	Konc. i prøve- bad mol/liter	Hæmning af bra- dykinineffekt, %	Varighed af hæmning, min.
H-D-Phe-Phe-Arg-NH ₂	V	10 ⁻⁷ 10 ⁻⁵	15 30	5 10
H-D-Phe-Phe-Arg-NH-heptyl	VI	10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 5·10 ⁻⁶ 10 ⁻⁵	25 65 95 100	5 25 25 35
H-D-Pro-Phe-Arg-NH-lauryl	VII	10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁵	10 15 100	5 10 25
H-D-Phe-Phe-Arg-NH-i-Pr	VIII	10 ⁻⁷ 10 ⁻⁵	5 30	5 5
H-D-Phe-Phe-Arg-NH-cyclo- hexyl	IX	10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁵	10 15 30	5 5 15

P a t e n t k r a v .

Analogifremgangsmåde til fremstilling af tripeptidamider eller -estere med den almene formel



hvor:

X betegner Pro eller Phe

Y betegner O-R₁ eller NH-R₂, hvor:

R₁ betegner en lige eller forgrenet alkylgruppe med 1-12 carbonatomer, og

R₂ betegner H eller en lige, forgrenet eller cyklisk alkylgruppe med 1-12 carbonatomer,

eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte heraf, k e n d e - t e g n e t ved, at de i peptidet indeholdte aminosyrer i vilkårlig rækkefølge og på inden for peptidkemien sædvanlig måde kondenseres til dannelse af et peptid med den ønskede aminosyresekvens, hvorefter eventuelle beskyttelsesgrupper fraspaltes, og det opnåede peptid om ønsket overføres i et syreadditionssalt deraf.

Fremdragne publikationer:
