



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **215 537 A1**

3(51) C 07 C 103/52

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 C / 250 498 1

(22) 02.05.83

(44) 14.11.84

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Henklein, Peter, Dr. rer. nat.; Halätsch, Wolf-Rainer, Dr. rer. nat.; Klose, Annerose; Niedrich, Hartmut, Prof. Dr. rer. nat. habil; Große, Christina, DD

(54) **Verfahren zur Synthese von Angiotensin I**

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Angiotensin I (AT I) /1/ Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu /1/. Das neue Herstellungsverfahren besteht in der Verknüpfung des N-terminalen Tetrapeptids mit dem C-terminalen Hexapeptid. Als Tetrapeptid wird das Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und als Hexapeptid H-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb eingesetzt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die pharmazeutische Industrie.

Verfahren zur Synthese von Angiotensin I

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Angiotensin I (AT I),

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu /1/

das sich für den Einsatz in RIA-Kits eignet.

Einsatzgebiet der Erfindung ist die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung von Angiotensin I ist bereits mehrfach beschrieben worden. Zum Einsatz gelangten sowohl Festphasenmethoden (M. C. Khosla et al., Med. Chemistry 20, (2) 315 (1977)) als auch klassische Verfahren in Lösung (H. Aoyagi, Bull. Chem. Soc. Japan 41, 433 (1968)). H. Aoyagi synthetisierte AT I aus zwei Fragmenten 5 + 5, wobei zur Kondensation beider Fragmente die Azidmethode eingesetzt wurde. Beide Histidinreste wurden durch Benzylgruppen in der Imidazolseitenkette geschützt.

Beiden Verfahren wohnen eine Reihe von Nachteilen inne, die einen Einsatz für industrielle Synthesen nicht vorteilhaft erscheinen lassen (aufwendige Reinigung und oftmals schwierige Reaktionsführung).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Dekapeptid der Formel 1 zu synthetisieren, das für den Einsatz in der RIA-Technik geeignet ist, das eine hohe Reinheit besitzt und dessen Synthese die Nachteile der angeführten Verfahren vermeidet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von Angiotensin I zu entwickeln. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß Angiotensin I aus zwei Fragmenten 1 - 4 und 5 - 10 nach folgendem Schema aufgebaut wurde:

Das N-terminale Tetrapeptid wird dabei stufenweise, das C-terminale Hexapeptid durch Kombination der Fragmente 5 - 6, 7 - 8 und 9 - 10 synthetisiert. Dabei wird das C-terminale Dipeptid erfindungsgemäß durch Aktivesterkupplung von Boc₂-His-ONp an Leucin-p-nitrobenzylester (hergestellt nach McLaren, Austr. J. Chem. 31, (1978) 1865) in guten Ausbeuten erhalten. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wird das Dipeptid entweder mittels Komplex "F" (J. Kovacs und L. Kisfaludy, J. Amer. Chem. Soc. 84, (1967) 183) oder unter Verwendung von DCCI/HONB mit dem Dipeptid Boc-Pro-Phe-OH zum Tetrapeptid Boc-Pro-Phe-His-Leu-ONb umgesetzt. Die Boc-Gruppenabspaltung mit HCl in Eisessig ergab das dünn-schicht-chromatographisch einheitliche Tetrapeptiddihydrochlorid, das anschließend mit Boc-Ile-His-OH durch Anwendung von DCCI/HONB zum Hexapeptid verlängert wurde. Zur Kondensation der beiden Hauptfragmente Z-Asp-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und H-Ile-His-Prophe-His-Leu-ONb wird Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) und N-Hydroxynorbornendicarboximid (HONB) im Verhältnis 1 : 3 angewandt, um die Racemisierung möglichst gering zu halten. Durch die Wahl der Schutzgruppen, N-terminal Benzyloxycarbonyl, C-terminal p-Nitrobenzylester und Nitro- für die Argininseitenkette wird eine problemlose Abspaltung aller Schutzgruppen ermöglicht. Das so erhaltene Rohprodukt besitzt bereits einen hohen Reinheitsgrad und kann durch Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose weiter gereinigt werden.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren an Beispielen erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Boc₂His-Leu-ONb

(MG 603,658)

2,47 g H-Leu-ONb·HCl (8 mmol) werden in 15 ml DMF gelöst, es werden 0,4 ml NMM addiert und auf +5 °C abgekühlt. Danach gibt man 3,9 g Boc₂His-ONp dazu und rührt über Nacht.

Aufarbeitung:

Das DMF wird abrotiert und das Öl in 30 ml Essigester aufgenommen. Die organische Phase wird bis zur Entfärbung mit

gesättigter Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Danach wird mit $\text{NaCl}/\text{H}_2\text{O}$ 2x gewaschen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Essigester wird abrotiert und der verbleibende ölige Rückstand mehrfach mit Hexan verrieben. Das halbfeste Produkt wird mit wenig Äther versetzt und das weiße gelartige Produkt mit Hexan verrieben.

Fp.: 92 - 94 °C weißes Pulver $[\alpha]_D^{26} = -7,59^\circ$
 Ausbeute: 4 g = 83 % c = 1 Methanol

Beispiel 2:

BOC-Pro-Phe-His-Leu-ONb (MG: 747,858)

1,73 g (4,78 mmol) BOC-Pro-Phe-OH wurden in 15 ml THF gelöst, 0,88 g (4,9 mmol) HONB hinzugegeben, auf 0 bis -5 °C gekühlt, 1,1 g (5,39 mmol) DCCI addiert und 45 Min. in der Kälte und 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgetrennt, mehrfach mit THF gewaschen und das mit den Waschlösungen vereinigte Filtrat am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das entstandene gelbliche Öl wurde in 10 ml DMF aufgenommen und mit in 15 ml DMF gelöstem 2,19 g (4,59 mmol) H-His-Leu-ONb aus dem Dihydrochlorid - mit 1,51 ml (13,6 mmol) N-Methylmorpholin freigesetzt - versetzt. Die Reaktionszeit betrug 15 Std. bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde filtriert und eingedunstet. Das entstandene Öl wurde in Essigester aufgenommen und nacheinander mit Natriumhydrogencarbonat, NaCl-gesättigter KHSO_4 -Lösung und NaCl-gesättigtem Wasser ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedunstet und das verbliebene Öl mit Hexan festgerieben.

Ausbeute: 3 g 88,2 %

Fr.: 129 - 32 °C

$$[\alpha]_D^{23} = -38,06$$

(c = 1, DMF)

DC: (A) S 3 einheitlich $R_F = 0,71$,

SBN: $R_F = 0,71$

BAW: $R_F = 0,66$ einheitlich

Beispiel 3:

BOC-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb (MG: 998,124)

530 mg (1,5 mmol) BOC-Ile-His-OH und 225 mg (1,65 mmol)

HONB wurden in 10 ml THF gelöst, auf -5°C gekühlt, mit 309 mg (1,5 mMol) DCCI versetzt und 45 Min. bei dieser Temperatur nachgerührt. Nach dem Abtrennen und mehrmaligem Waschen des Harnstoffs wurden die mit dem Filtrat vereinigten Waschlösungen eingeeengt und das verbleibende Öl in 10 ml DMF aufgenommen und mit 872 mg (1,35 mMol) H-Pro-Phe-His-Leu-ONb x 2HCl versetzt und 0,45 ml (4 mMol) N-Methylmorpholin addiert. Nach 18 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt, das verbleibende Öl in Chloroform aufgenommen und nacheinander mit NaCl-gesättigter KHSO_4 -, NaHCO_3 -Lösung und NaCl-gesättigtem Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über MgSO_4 wurde eingeeengt und das verbleibende Öl mit Hexan festgerieben.

Rohausbeute: 1,09 g (74 %)

Fp.: $160 - 63^{\circ}\text{C}$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -47,58$$

Die Substanz zeigte im DC (B) neben einem kräftigen Hauptfleck noch zwei Nebenflecken.

Beispiel 4:

Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb x 2HCl (MG: 1007,405)

889 mg (0,89 mMol) BOC-Hexapeptid wurden in 10 ml 3 N HCl/AcOH gelöst und 40 Min. gerührt. Nach 35 Min. war die BOC-Abspaltung laut DC in S 3 vollständig. Die Reaktionslösung wurde in 40 ml Ether gegossen, der ausgefallene flockige Niederschlag abgetrennt und mehrfach auf der Fritte mit Ether verrieben. Nach kurzer Lufttrocknung erfolgte die Entfernung des restl. Lösungsmittels über KOH u. P_2O_5 im Vakuum.

Ausbeute: 760 mg (84 %)

Fp.: $168 - 70^{\circ}$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -35,03 \quad (c = 1, \text{ MeOH})$$

DC: (B) BAW $R_F = 0,64$

Beispiel 5:

Z-Asp(OBzl)-Arg(NO_2)-Val-Tyr-OH (MG: 820,83)

1,43 g (4 mMol) Z-Asp(OBzl)-OH werden in 15 ml THF gelöst, mit 920 mg (5 mMol) Pentafluorphenol versetzt und auf -5°C gekühlt. Nach der Zugabe von 825 mg (4 mMol) DCCI wurde

30 Min. bei dieser Temperatur und 20 Min. bei Raumtemperatur nachgerührt. Der gebildete Harnstoff wird abgetrennt, gewaschen, die Waschlösungen mit dem Filtrat vereinigt und eingeeengt. Das entstandene Öl wurde in 20 ml DMF aufgenommen und mit 2,75 g (5 mMol) H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH x 1,16 HBr in 10 ml DMF unter Zusatz von 1,35 ml (2,2 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und 5 Std. bei Raumtemperatur gerührt. (Der pH-Wert muß bei pH 7 - 8 liegen). Die Lösung wird filtriert und bis auf ca. 1/3 des ursprünglichen Volumens eingeeengt und in eiskalte 1 N HCl (NaCl gesättigt) getropft. Der entstandene weiße Niederschlag wird abgetrennt, mehrfach mit Wasser gewaschen, an der Luft und anschließend im Vakuum über KOH und P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 3,09 g (94 %)

DC: (A) einheitlich in S 3 $[\alpha]_D^{23} = - 3,74$
(c = 1, DMF)

Beispiel 6:

Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb
(MG: 1700,895)

780 mg (0,95 mMol) Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und 292 mg (1,35 mMol) HONB in 5 ml DMF gelöst, auf - 5 °C gekühlt und 247 mg (1,2 mMol) DCCI addiert. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 4 Std. nachgerührt. Dann wurden 850 mg (0,84 mMol) H-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb x 3HCl und 0,36 ml (3,36 mMol) N-Methylmorpholin in 5 ml DMF hinzugefügt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer etwas eingeeengt und in Essigester gegossen, der ausgefallene Feststoff abgetrennt und mit K₂CO₃-Lösung gewaschen. Der etwas schmierige Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,22 g (86 %)

Fp.: 163 - 65 °C

Fp.: 178 - 80 °C (nach Umkristallisation)

DC: (A) vor der Umkristallisation aus Ethanol

BAW Py R_F = 0,81 einheitlich

BAW $R_F = 0,51$ = Hauptfleck, $R_F = 0,8$ = Nebenfleck

SBN $R_F = 0,56$ = Hauptfleck, $R_F = 0,32$ = Nebenfleck

Anfärbung mit Pauly-Reagenz und TDM

Ausbeute nach Umkristallisation: 1,07 g (75 %)

Beispiel 7:

H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH x X HOAc x
Y H₂O (MG: 1296,97)

760 mg (0,45 mMol) geschütztes Dekapeptid wurde in 10 ml Hydrierlösung (MeOH/AcOH/H₂O; 3:3:1) gelöst, mit 135mg frisch hergestelltem Pd-schwarz-Katalysator versetzt und unter dem Wasserstoffstrom gerührt (Verhältnis Schutzgruppen : Katalysatormenge 100 mg/mMol). Nach 24 Std. wurde der Katalysator abzentrifugiert und die Reaktionslösung weitere 21 Std. mit frischem Katalysator hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators wurde die Lösung eingeeengt und der ölige Rest mit Ethanol festgerieben und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 401 mg (70 %)

DC: (A) SBN $R_F = 0,24$ Hauptfleck;
 $R_F = 0,32$ und $0,36$ zwei schwache Nebenflecken

BAW Py $R_F = 0,76$ keine Nebenflecken

Beispiel 8:

Durchführung der Chromatographie

Ca. 1 g Rohprodukt wurden in 5 ml Startpuffer gelöst und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Nach dem Auftragen wird mit einem linearen Gradienten von 0,01 bis 0,1 N NH₄OAc bei pH 6 eluiert. Substanz wurde bei einer Ionenstärke von ca. 0,08 N NH₄OAc eluiert. Die Extinktion des Eluats wird bei 252 nm über einen Uvicord II verfolgt. Die entsprechenden Fraktionen wurden über DC kontrolliert und selektiert. Nach zweimaliger Lyophilisierung (zur vollständigen Entfernung des NH₄OAc) wurden aus verschiedenen Ansätzen 500 bis 700 mg AT I isoliert. Es wurde eine Säule 2,8 x 40 cm benutzt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 50 ml/h.

Rechromatographische Kontrolle an CMG (250 mg) ergab einen einheitlichen symmetrischen peak und 230 mg AT I.

Substanzcharakteristik:

H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu • X CH₃COOH •
Y H₂O

X = ca. 2 Y = 5 - 8

Molmasse 1296,97 für 100%iges Peptid

weißes Lyophilisat, geruchlos, leicht löslich in Wasser,
eine 0,1 m Lösung ist farblos

Schmelzbereich 248 - 258 °C

Optische Drehung $[\alpha]_D^{23} = 46,6^\circ$ c = 1 in 0,05 M Essig-
säure

DS-Chromatographie einheitlich in

SBN Rf = 0,2 - 0,3

BAW Py Rf = 0,7 - 0,8

Verwendete Abkürzungen

AT I	Angiotensin I
BAW	Butanol/Eisessig/Wasser
Boc/BOC	tert.-Butyloxycarbonyl
CMC	Carboxymethylcellulose
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
HONB	N-Hydroxy-5-norbornendicarboximid
NMM	N-Methylmorpholin
- ONb	- Nitrobenzylester
- ONp	- Nitrophenylester
THF	- Tetrahydrofuran
SBN	sek. Butanol/3 % Ammoniak
Z	Benzyloxycarbonyl

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Angiotensin I /1/, dadurch gekennzeichnet, daß man das N-terminale Tetrapeptid Asp-Arg-Val-Tyr mit dem Hexapeptid Ile-His-Pro-Phe-His-Leu kondensiert.

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu /1/

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Tetrapeptid das Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und als Hexapeptid das H-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-ONb eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Hexapeptid Verwendung findet, das durch Kombination der Fragmente His-Leu, Pro-Phe und Ile-His dergestalt synthetisiert wird, daß H-His-Leu-ONb und Boc-Pro-Phe-OH zum Boc-Pro-Phe-His-Leu-ONb umgesetzt werden und daraus nach Abspaltung der Boc-Gruppe das C-terminale Hexapeptid durch Verknüpfen mit Boc-Ile-His-OH gewonnen wird.
4. Verfahren nach Punkt 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein C-terminales Dipeptid His-Leu Verwendung findet, das aus Boc₂-His-ONp und Leucin-p-nitrobenzylester, vorzugsweise durch Aktivesterkupplung, gebildet wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fragmente 1 - 4 und 5 - 10 unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxynorbornendicarboximid im Verhältnis 1 : 3 kondensiert und danach die Schutzgruppen abgespalten werden.