

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 82 00361

⑤④ Sulfate de D-phénylalani-L-prolyl-L-arginine aldéhyde et procédé pour le préparer.

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

②② Date de dépôt..... 12 janvier 1982.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *Hongrie, 13 janvier 1981, n° 70/81.*

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 28 du 16-7-1982.

⑦① Déposant : Société dite : RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT, société régie par les
lois en vigueur en Hongrie, résidant en Hongrie.

⑦② Invention de : Sándor Bajusz, Erzsébet Széll née Hasenöhr, Eva Barabás et Dániel Bagdy.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

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

La présente invention est relative au sulfate de D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde extrêmement stable en solution aqueuse et à un procédé pour le préparer.

5 Il est connu que l'héparine, des polyanions de structure apparentée (des héparinoïdes) et des dérivés de la coumarine, sont principalement appliqués à l'heure actuelle en thérapie anticoagulante. Une caractéristique commune de ces agents, est qu'ils ne réussissent pas à
10 induire une inhibition directe de la réaction protéolytique, déclenchant la coagulation du sang. L'héparine, à titre de catalyseur, accélère l'action inhibitrice de l'un des inhibiteurs du plasma, l'antithrombine III, sur les enzymes impliquées dans le procédé de coagulation, surtout celle
15 de la thrombine, tandis que les dérivés de la coumarine inhibent la biosynthèse des protéines contenant des parties "acide γ -carboxy-glutamique" (Gla). Il existe quatre protéines de ce type qui sont impliquées dans le procédé de coagulation du sang, l'une de celles-ci étant la pro-
20 thrombine. Des facteurs de coagulation du sang dépourvus de résidus Gla ou en ayant un nombre inférieur à la valeur normale, sont inactifs et ne participent pas au procédé de coagulation. Il faut remarquer, cependant, que cette inhibition couvre la synthèse de toute la gamme des protéines contenant du Gla, c'est-à-dire que l'un des inhibi-
25 teurs naturels du procédé de coagulation, la protéine C (ou facteur XIV) est aussi synthétisée sous forme inactive en présence de dérivés de la coumarine, ce qui constitue plutôt un inconvénient. Il est également un aspect caractéristique à noter, à savoir que l'héparine est administrée
30 principalement par injection intraveineuse, car celle-là est pratiquement inactive par voie orale, tandis que les dérivés de la coumarine ne peuvent être appliqués que par voie orale. En conséquence, l'effet exercé par l'héparine peut être rapidement enregistré, en une courte période de
35 temps, tandis que celui que fournissent des dérivés de la

coumarine - étant des inhibiteurs de synthèse - n'apparaît qu'après une période de 24 à 36 heures.

De plus, il est connu qu'il existe des tripeptide-aldéhydes qui présentent aussi une activité anticoagulante ;
5 cependant, contrairement aux agents ci-dessus, ils entrent en réaction directe avec la thrombine, en inhibant ses réactions protéolytiques même en l'absence d'antithrombine III. L'acétate de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde, décrit dans le Brevet hongrois n° 169 870, ainsi que le
10 D-phénylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-arginine aldéhyde, décrit dans le Brevet belge n° 880 844, sont tous deux de puissants inhibiteurs de thrombine.

Il est observé que l'activité antithrombine des sels synthétiques ci-dessus d'arginine-peptide aldéhyde
15 - en particulier de ceux des composés portant un groupe amino-terminal libre - c'est-à-dire l'acétate ou le chlorhydrate de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine - est variable et qu'elle diminue rapidement lorsque le composé reste en solution aqueuse, rendant impossible une
20 application thérapeutique. Bien que le dérivé N^G-carboxy-des tripeptide aldéhydes libres, c'est-à-dire le D-phénylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-arginine aldéhyde, conserve pendant 20 à 24 heures son activité dans une solution tampon aqueuse, après plusieurs jours, cependant, on observe
25 déjà une notable réduction de l'activité et après plusieurs mois, il y a perte de l'activité initiale, même sous forme solide.

La présente invention est relative à un nouveau sel de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde, qui,
30 contrairement aux autres produits connus jusqu'à maintenant, est stable également en solution aqueuse, et à un procédé pour le préparer.

On a constaté que la stabilité des divers sels de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde est variable
35 en solution aqueuse, c'est-à-dire dans une solution saline isotonique et cela de façon significative. Au cours des tests

réalisés par la Demanderesse, les peptides sont dissous à la concentration de 10 mg/ml, conservés à 5°C et la modification concomitante de l'activité antithrombine est enregistrée pendant 180 jours. L'activité est évaluée dans un système contenant les composants suivants :

0,2 ml de fibrinogène de bovin à 0,5 % dans une solution à 0,9 % de chlorure de sodium,

0,1 ml de tampon au chlorhydrate de tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-acide chlorhydrique (pH : 7,2) contenant la solution de peptide,

0,1 ml de Thrombine Humaine Standard US (NIH, Bethesda, Maryland, USA), solution à 10 unités/ml.

Le temps de thrombine du système dépourvu de thrombine est de 15s, mesuré dans le "Schnither-Gross Coagulometer".

On attribue arbitrairement la valeur de 100 à l'activité de la solution de tripeptide aldéhyde, si le mélange réactionnel induit un temps de thrombine relatif cinq fois plus long pour une concentration finale de $3,5 \times 10^{-7}$ M, dans le cas du sulfate de tripeptide aldéhyde à la concentration de 0,175 µg/ml.

Les données d'essai sont rassemblées dans le Tableau I. Il est apparent que le sulfate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde conserve son activité antithrombine pendant 90 jours, alors que l'activité du chlorhydrate correspondant en solution saline isotonique commence à diminuer au bout de 5 jours et que celle de l'acétate, du citrate, du tartrate et du tosylate est réduite déjà après quelques jours (de même que celle du dérivé N^G-carboxy- du tripeptide aldéhyde libre ayant des propriétés apparentées). Dans des essais de stabilité prolongée, le sulfate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde se révèle stable même pendant 180 jours en milieu aqueux et, sous forme solide, il ne perd pas de même son activité pendant 6 mois.

35 30 25 20 15 10 5

TABLEAU I

Activité antithrombine des sels de tripeptide aldéhyde en solution saline isotonique

Peptide aldéhyde ^a	activité ^b relative					après	
	0	5	10	15	20	40	90
	jours						
D-Phe-Pro-Arg-H, 2 CH ₃ COOH ^{cd}	70-50	60-40	40-30	40-30	40-30	35-25	30-20 ^a
D-Phe-Pro-Arg-H, 2HCl ^c	90-60	90-60	80-50	70-40	60-40	50-30	40-30
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H ^e	100	80	60	50	30	25	20
D-Phe-Pro-Arg-H, H ₂ SO ₄ ^f	100	100	100	100	100	100	100

- a) Les abréviations utilisées sont conformes à celles qui sont établies dans la littérature [C'est-à-dire dans J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)], Z représentant des groupes benzyloxy-carbonyles, Arg(COOH) et resp., Arg(Z) représentant des groupes NG-carboxy- et NG-benzyloxy-carbonyl-L-arginine resp.)
- b) Le peptide aldéhyde induisant un temps de thrombine relatif quintuple à une concentration finale de $3,5 \times 10^{-7}$ M dans le mélange de réaction, à une activité antithrombine de 100
- c) Produit obtenu par hydrogénéolyse du Z-D-Phe-Pro-Arg(Z)-H en présence d'une quantité équivalente d'acide
- d) L'activité antithrombine des citrate, tartrate et tosylate correspondants varie de la même façon que celle de l'acétate
- e) Produit synthétisé selon le procédé qui est décrit dans le Brevet belge n° 880 844
- f) Produit préparé conformément au procédé de la présente invention.

Afin de simuler des conditions physiologiques, on évalue l'activité antithrombine des sels de tripeptide aldéhyde ainsi que celle des dérivés d'acide carbamique, également sur du plasma humain dans le système suivant :

- 5 0,2 ml de plasma humain citraté,
 0,1 ml d'une solution tampon de chlorhydrate de
 tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-acide chlorhydrique
 (pH : 7,2) contenant la solution de peptide, et
 10 0,1 ml de Thrombine Humaine Standard US (NIH, Bethesda
 Maryland, USA), solution à 10 unités/ml.

Le temps de thrombine du système dépourvu de peptide est de 15 s, mesuré dans le "Schnither-Gross Coagulometer".

TABLEAU 2

Activité antithrombine des dérivés de
 15 tripeptide aldéhyde dans du plasma humain

Peptide aldéhyde	quantité de peptide ($\mu\text{g/ml}^+$) nécessaire pour doubler le temps de thrombine immédia- tement après dissolution du peptide	acti- vité rela- tive
D-Phe-Pro-Arg-H, H_2SO_4	0,020	100
D-Phe-Pro-Arg (COOH)-H	0,042	45
D-Phe-Pro-Arg-H, 2 CH_3COOH	0,065 - 0,140	35-14
D-Phe-Pro-Arg-H, 2 HCl	0,060 - 0,130	33-15
25 Héparine ^a	0,105	19

a) Valeur mesurée avec de l'héparine industrielle
 (132,2 U/mg, U.S. Ph. XVII)

+ Quantité de peptide dans le mélange réactionnel.

- 30 Les données du Tableau 2 montrent clairement que la
 quantité de peptide nécessaire pour doubler le temps de
 thrombine par rapport au témoin, varie en fonction du lot
 utilisé dans le cas de l'acétate et du chlorhydrate et
 qu'elle est un multiple - dans le cas du dérivé d'acide
 35 carbamique, elle est le double - de la quantité requise
 dans le cas du sulfate du tripeptide aldéhyde.

L'essai in vivo des dérivés de tripeptide aldéhyde est résumé dans le Tableau 3. Le sulfate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde présente une activité anti-thrombine valable in vivo. Lorsqu'il est appliqué par voie intraveineuse et sous-cutanée, son activité est semblable à celle de l'héparine, appliquée généralement en thérapie, cependant, il offre des avantages majeurs par rapport à celle-ci. Alors que l'héparine est inactive par voie orale, l'effet thérapeutique du sulfate peut être obtenu avec des doses orales de 25 mg/kg, tandis qu'il faut des doses de 50 mg/kg dans le cas du dérivé d'acide carbamique.

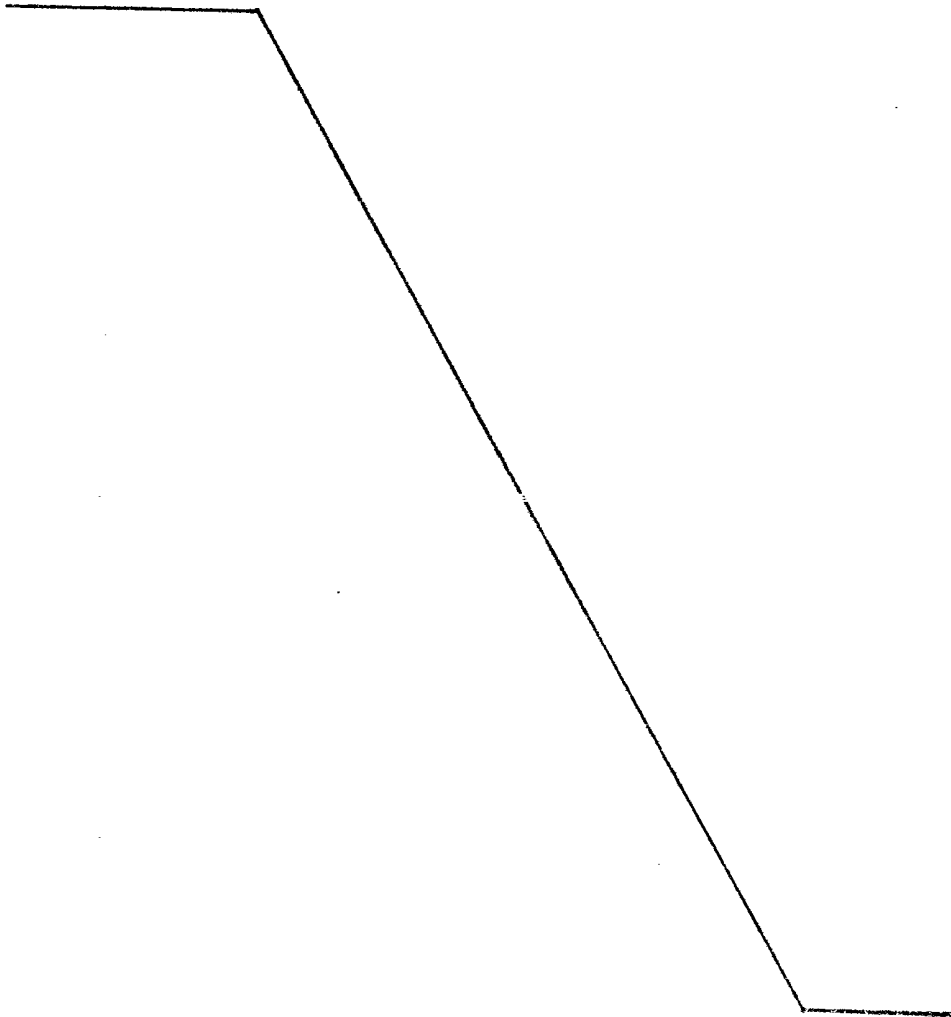


TABLEAU 3
Dose requise pour l'obtention d'un effet thérapeutique^a

Peptide aldéhyde	mg/kg heure					
	injection par voie intraveineuse		sous cutanée		per os	
	lapin	chien	lapin	chien	lapin	chien
D-Phe-Pro-Arg-H,2 CH ₃ COOH	-	-	-	-	100	100
D-Phe-Pro-Arg-H,2 HCl	-	-	-	-	-	100
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H	-	3,0	10,0	6,0	50	50
D-Phe-Pro-Arg-H,H ₂ SO ₄	1,0	0,5	6,0	6,0	25	25
Héparine	0,6	0,5	5,0	2,0	-	-

a) L'effet thérapeutique est caractérisé par la dose qui est nécessaire pour prolonger le temps de thrombine de 1,5 à 2,5 fois dans le sang entier [Nies, A. S. (1978) dans Clinical Pharmacology (Melmon, K. L. et Morrelli, F. F. Eds.) 2nd Ed. pp. 303 à 306, Macmillan Publ. Co. Inc. New York ; et Versaete, M. et Verwilghan, R. (1980) dans Drug Treatment, Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2nd Ed., Avery G. S. Ed. (1980) pp. 889 à 952, Edinburgh and London/].

Les données de toxicité fournies par le sulfate de D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde sont également plus avantageuses que celles de l'acétate ou du dérivé d'acide carbamique. Les données de toxicité aiguë sont rassemblées dans le Tableau 4. Dans le cas du sulfate de tripeptide aldéhyde administré par voie orale, celle-ci se monte à 2 g/kg.

TABLEAU 4

Données de toxicité aiguë chez la souris

Peptide aldéhyde	DL ₅₀ mg/kg			
	i.v. grosse pilule	i.p.	s.c.	p.o.
15 D-Phe-Pro-Arg-H, 2CH ₃ COOH	9	38	-	960
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H ^a	-	-	-	1200
D-Phe-Pro-Arg-H, H ₂ SO ₄	45 ^b	230	1800	>2000
Héparine	aucune donnée disponible dans la littérature			

20 a) Etant donné la médiocre solubilité des produits, les données de toxicité obtenues pour des applications autres qu'orales, sont plutôt incertaines.

b) Pour l'injection intraveineuse, la DL₅₀ atteint
25 58 mg/kg chez le lapin

Etant donné la faible toxicité et la forte activité du sulfate du D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde, l'indice thérapeutique, tenant compte de ces deux données, et étant l'indicateur le plus caractéristique de l'intérêt thérapeutique d'un médicament, est plus favorable que
30 ceux des autres dérivés de tripeptide aldéhyde.

A partir d'essais de perfusion intraveineuse chez les chiens, on évalue à 1 à 2 mg/kg/heure la dose de la perfusion intraveineuse pour l'homme.

35 On a constaté que le sulfate de D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde peut être préparé selon une

méthode connue en elle-même, en soumettant du benzyloxy-carbonyl-D-phénylalananyl-L-prolyl-N^G-benzyloxy-carbonyl-L-arginine aldéhyde (Z-D-Phé-Pro-Arg(Z)-H) à une hydrogénéolyse, en présence de quantités équivalentes d'acide sulfurique. De plus, il peut être simplement préparé avec une pureté suffisante, à partir de son dérivé sensible à l'acide contenant un groupe protecteur triphénylméthyle ou t-alkyloxy-carbonyle, c'est-à-dire à partir de l'hémisulfate du t-butyloxy-carbonyl-D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine alkyde ou du t-butyloxy-carbonyl-D-phénylalananyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-arginine aldéhyde, avec de l'acide sulfurique 1 à 12N. En même temps, les méthodes suivantes, connues en elles-mêmes, ne fournissent pas de résultats satisfaisants :

- 15 a) Acidolyse du groupe t-butyloxy-carbonyle avec de l'acide sulfurique dissous dans de l'acide acétique [Beyerman et coll. : dans Peptides, 1970 (Ed. H. NESVADBA), p. 138, North Holland, Amsterdam, 1973].
- b) Conversion directe du dérivé d'acide carbamique
20 D-Phé-Pro-Arg-(COOH)-H selon le Brevet Belge n° 880 844 avec de l'acide sulfurique en sulfate de tripeptide aldéhyde non protégé.
- c) Transformation de divers autres sels de tripeptide
aldéhyde non protégés, c'est-à-dire de l'acétate de
25 D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde selon le Brevet hongrois n° 169 870 en son sulfate, soit avec une résine échangeuse d'ion, soit avec de l'acide sulfurique.

Les produits obtenus conformément à l'une des méthodes a à c, s'avèrent présenter une médiocre homogénéité et/ou stabilité en solution aqueuse.

A partir de ces faits, la présente invention est relative au sulfate de D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde et à un procédé pour le préparer à partir de
35 l'hémisulfate de D-phénylalananyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde ou du D-phénylalananyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-arginine aldéhyde,

contenant un groupe protecteur sensible à l'acide sur son groupe amino-terminal, selon lequel le groupe protecteur placé sur le groupe amino-terminal et sensible à l'acide et éventuellement le groupe N^G-carboxy- est éliminé avec
5 de l'acide sulfurique 1 à 12N, appliqué en 1 à 12 quantités équivalentes et le sulfate de tripeptide aldéhyde libre résultant est isolé.

Conformément à un procédé préféré de la présente invention, le L-arginine lactame, dont le groupe guanidino-
10 est protégé avec un groupe benzyloxycarbonyle, est condensé avec de la t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaniyl-L-proline, le tripeptide lactame bloqué résultant est réduit et le groupe benzyloxycarbonyle sur le groupe guanidino- du tripeptide aldéhyde protégé obtenu est soumis à une hydrogénéolyse
15 dans de l'éthanol ou du tétrahydrofurane contenant 30 à 40 % d'eau, en présence d'une quantité équivalente d'acide sulfurique. L'hémisulfate de tripeptide aldéhyde résultant, dont le groupe amino-terminal est toujours protégé, est dissous dans 8 à 12 équivalents, de préférence 10 équiva-
20 lents d'acide sulfurique 4 à 6N, de préférence 5N et chauffé pendant 20 à 40 minutes, de préférence 30 minutes à 40-60°C, de préférence à 50°C ; la solution est ensuite neutralisée avec du carbonate de calcium, filtrée et de préférence lyophilisée.

25 Le produit préparé de cette façon peut éventuellement contenir 4 à 6 % de sulfate de calcium, qui cependant n'affecte ni son activité biologique, ni son application thérapeutique.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention
30 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 exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente
35 invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples

de mise en oeuvre, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Les valeurs R_f indiquées dans les exemples sont
5 déterminées par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Kieselgel G, Reanal, Budapest) dans les systèmes suivants :

- 1) Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau :
480:20:6:11
- 10 2) Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau :
60:20:6:11
- 3) Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau :
30:20:6:11.

EXEMPLE 1

15 Sulfate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde

De l'hémisulfate de t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde (2,74 g, 5 mmoles) est dissous dans 5 ml d'eau, additionné de 5 ml d'acide sulfurique 10N sous agitation constante et le mélange est chauffé à 50°C. La solution est agitée pendant 15 minutes à 50°C,
20 puis diluée avec de l'eau glacée (25 ml) et son pH est ajusté à 6,5 avec du carbonate de calcium (environ 2,25 g), tandis que le système est refroidi par de la glace. Le sulfate de calcium précipité est filtré et lavé deux fois avec de
25 l'eau (5 ml). Le filtrat est extrait à deux reprises avec du n-butanol (10 ml), concentré à environ 30 ml, filtré si nécessaire et lyophilisé. Le rendement est de 2,25 g (79 %) du produit du titre, contenant 4,8 % de sulfate de calcium.

$R_f = 0,35$ à $0,40$

30 $\left[\alpha \right]_D^{20} = -117 \pm 1^\circ$ (c = 1, eau)

Analyse calculée pour $C_{20}H_{30}O_3N_6, H_2SO_4, 3 H_2O, 0,2$

$CaSO_4$ (565,85) :

Valeurs calculées : C 42,45, H 6,77, N 14,85, SO_4 20,37,
Ca 1,41, H_2O 9,55 %

35 Valeurs trouvées : C 42,2, H 6,9, N 14,85, SO_4 19,8,
Ca 1,3, H_2O 9,75 %

Les matières de départ sont synthétisées conformément à la procédure suivante.

Etape 1 : t-butyloxycarbonyl-D-phénylalanyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-arginine lactame

- 5 Du t-butyloxycarbonyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-arginine lactame (8,6 g, 22 mmoles, Brevet belge n° 880 844) est mis en suspension dans de l'acétate d'éthyle (20 ml) et à 5°C et sous agitation constante. Une solution d'acide chlorhydrique 4N dans l'acétate
- 10 d'éthyle (40 ml) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes sous refroidissement par de la glace, dilué avec de l'acétate d'éthyle froid (100 ml) ; le précipité formé est filtré, lavé avec de l'acétate d'éthyle et séché sous pression réduite dans un dessicateur sur hydroxyde de potassium. Le chlorhydrate de N^G-benzyloxycarbonyl-L-arginine lactame résultant est dissous dans du diméthylformamide (20 ml) et additionné à -10°C, de triéthylamine (6,2 ml, 44 mmoles). La suspension formée est ajoutée à l'anhydride mixte suivant.
- 15 On dissout de la t-butyloxycarbonyl-D-phénylalanyl-L-proline [U. Ludescher et R. Schwyzer : Helv. Chem. Acta 55, 2052 (1972)] à raison de 7,25 g, 20 mmoles, et de la N-méthyl-morpholine (2,22 ml, 20 mmoles), dans du diméthylformamide (20 ml). La solution est refroidie
- 25 à -15°C; additionnée de chloroformate d'isobutyle (2,64 ml, 20 mmoles) sous agitation ; puis, cinq minutes après, la solution ci-dessus dans le diméthylformamide est ajoutée. L'agitation est poursuivie pendant une heure à -15°C et pendant une heure à 0°C, puis le mélange réactionnel
- 30 est dilué avec du benzène (30 ml), les sels précipités sont filtrés et lavés à deux reprises avec du benzène (10 ml). La solution de benzène-diméthylformamide est diluée avec de l'eau (50 ml) et les phases sont séparées. La couche aqueuse est extraite à deux reprises avec du benzène
- 35 (10 ml), puis les extraits benzéniques réunis sont lavés trois fois avec une solution de carbonate de sodium à 10 %

(30 ml), de l'eau (30 ml), trois fois avec de l'acide sulfurique 0,5N (30 ml), deux fois avec de l'eau (30 ml) et la solution est évaporée sous pression réduite après séchage sur sulfate de sodium anhydre. Le résidu d'évaporation est homogénéisé avec de l'éther de pétrole, filtré, lavé avec de l'éther de pétrole et séché à l'air. Rendement : 9,65 g (76 %) du produit du titre.

$R_f = 0,81$ à $0,89$.

Etape 2 : t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-arginine aldéhyde

Du tripeptide lactame (9,52 g, 15 mmoles), étape 1) est dissous dans du tétrahydrofurane (45 ml) et à -20°C sous agitation vigoureuse, de l'hydrure aluminolithique (11,25 mmoles) est ajouté dans du tétrahydrofurane (environ 28 ml d'une solution 0,4M). Le déroulement de la réduction est suivi par chromatographie en couche mince ($\bar{R}_f^1 = 0,71$ à $0,77$ (lactame) et $R_f^1 = 0,31$ à $0,39$ (aldéhyde)]. Si nécessaire une autre position de la solution d'hydrure est ajoutée. Lorsque la réaction est achevée, la solution dans du tétrahydrofurane est acidifiée avec précaution, avec de l'acide sulfurique 0,5N à un pH de 3, puis diluée de telle sorte qu'il n'apparait pas de précipité (environ 100 ml). La solution aqueuse de tétrahydrofurane est extraite à trois reprises avec du chlorure de méthylène (75 ml) et les extraits réunis de chlorure de méthylène sont lavés trois fois avec une solution de carbonate de sodium à 10 % (10 ml), puis deux fois avec de l'eau (10 ml). La solution de chlorure de méthylène est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporé sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est dissous dans du benzène (50 ml) et la solution est à nouveau évaporée sous pression réduite. La dissolution et l'évaporation sont répétées une fois de plus. Le résidu d'évaporation est travaillé avec de l'éther, filtré, lavé avec du diéthyléther et séché à l'air. Rendement : 6,9 g (72 %) du composé du titre.

$R_f^1 = 0,3$ à $0,4$.

Etape 3 : Hémisulfate de t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaniyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde

Le tripeptide aldéhyde protégé (6,4 g, 10⁻⁵ moles, étape 2) est dissous dans un mélange d'eau (50 ml), de tétrahydrofurane (50 ml) et d'acide sulfurique normal (10 ml) et soumis à une hydrogénolyse en présence d'un catalyseur (1 g) constitué par du charbon portant 10 % de palladium. Le déroulement de la réaction est suivi par chromatographie en couche mince ($R_f^2 = 0,95$ à 1,0 [tripeptide aldéhyde dont le groupe guanidino- est protégé] et $R_f^2 = 0,45$ à 0,54 [tripeptide aldéhyde non protégé]). Lorsque la réaction est achevée, le catalyseur est filtré, lavé avec une solution (30 ml) de tétrahydrofurane aqueux à 50 % et les filtrats réunis sont concentrés sous pression réduite à environ 60 ml. Le résidu est extrait à quatre reprises avec du n-butanol. Les couches n-butanoliques sont combinées et évaporées à sec, sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est travaillé avec un mélange de diéthyléther-diisopropyléther (1:1), filtré, lavé avec le mélange ci-dessus, puis séché sous pression réduite dans un dessiccateur. Rendement : 4,4 g (80 %) du composé du titre.

$$R_f^2 = 0,45 \text{ à } 0,54$$

$$\angle \alpha_D^{20} = -65 \pm 1^\circ \text{ (c = 1, eau).}$$

25 Analyse calculée pour $C_{25}H_{38}O_5N_6$, 0,5 H_2SO_4 (551,64) :
Valeurs calculées : C 54,43, H 7,13, N 15,23, SO_4 8,71 %
Valeurs trouvées : C 54,5, H 7,3, N 15,2, SO_4 8,7 %

EXEMPLE 2

30 Sulfate de D-phénylalaniyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde

Du t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaniyl-L-prolyl-L-^NG-carboxy-L-arginine aldéhyde (2,85 g, 5⁻⁵ moles) est dissous dans de l'eau (5 ml) ; de l'acide sulfurique 10N (5 ml) est ajouté et le système est chauffé à 50°C. La solution est agitée pendant 15 minutes à 50°C, puis diluée avec de l'eau mélangée à de la glace (15 ml) et son pH est

ajusté à 6,5 à l'aide d'hydroxyde de calcium solide (environ 1,6 g) tandis qu'un refroidissement par la glace est assuré. Le sulfate de calcium précipité est filtré et lavé deux fois à l'eau (5 ml). Le filtrat est extrait à deux
 5 reprises avec du n-butanol (10 ml), concentré sous pression réduite à environ 30 ml, filtré si nécessaire et ensuite lyophilisé. Rendement : 2,3 g (81 %) du composé du titre, contenant 4,9 % de sulfate de calcium.

$$R_f^3 = 0,35 \text{ à } 0,40$$

10 $\angle_{\alpha-D}^{20} = -117 \pm 1^\circ$ (c = 1, eau).

La matière de départ est préparée selon la procédure suivante.

Du t-butyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-arginine aldéhyde (6,4 g, 10 mmoles,
 15 exemple 1, étape 2) est dissous dans de l'éthanol aqueux à 75 % (100 ml) et soumis à une hydrogénolyse en présence d'un catalyseur (1 g) constitué par du charbon portant 10 % de palladium. Le déroulement de la réaction est suivi par chromatographie en couche mince $\angle_{R_f}^2 = 0,90$ à 0,95
 20 (tripeptide aldéhyde protégé) et 0,45 à 0,55 (dérivé N^G-carboxy)7. A la fin de la réaction, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau (30 ml) et le filtrat est concentré à 30-40 ml sous pression réduite. Le résidu est dilué avec de l'eau (100 ml), extrait à deux reprises avec du chlorure
 25 de méthylène (20 ml) et lyophilisé. Rendement : 5,1 g (85 %) du composé du titre.

$$R_f^2 = 0,45 \text{ à } 0,55.$$

Analyse des amino-acides : Phe = 0,96, Pro = 1 (amino-acide de référence). PM en fonction de l'analyse
 30 des amino-acides : 570.

EXEMPLE 3

Préparation d'une composition pharmaceutique

Une préparation en deux ampoules, convenable pour
 6 à 12 heures de perfusion intraveineuse, est préparée
 35 de la façon suivante.

Du sulfate de D-phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine

aldéhyde (420 à 840 mg) et de l'albumine humaine (40 à 80 mg) sont soumis à une lyophilisation commune. Le contenu de l'ampoule lyophilisée est dissous avant d'être utilisé dans une solution saline isotonique stérile et dépourvue de germes (100 à 200 ml).

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 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.

REVENDICATIONS

1°- Nouveau sel de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde caractérisé en ce qu'il s'agit du sulfate extrêmement stable en solution aqueuse.

5 2°- Procédé de préparation du sulfate de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde à partir de l'hémisulfate de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde ou du D-phénylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-arginine aldéhyde dont le groupe amino-terminalest protégé par un groupe
10 protecteur sensible à l'acide, caractérisé en ce qu'on élimine le groupe protecteur sensible à l'acide du groupe amino-terminal et éventuellement le groupe N^G-carboxy-, à l'aide d'acide sulfurique 1 à 12N, appliqué en 1 à 12 quantités équivalentes et en ce que l'on isole le sulfate de
15 tripeptide aldéhyde libre résultant.

3°- Procédé selon la Revendication 2, caractérisé en ce qu'un groupe t-alcoylocarbone, de préférence le groupe t-butyloxy-carbone, est appliqué à titre de groupe protecteur sensible à l'acide de la matière de départ.

20 4°- Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique anticoagulante, caractérisé en ce que du sulfate de D-phénylalanyl-L-prolyl-L-arginine aldéhyde est converti, avec des supports pharmaceutiques, selon des méthodes connues en elles-mêmes pour préparer des médicaments, en comprimés, capsules, solutions à injecter ou compositions
25 similaires.