

PATENTSCHRIFT 140 877

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 140 877 (44) 02.04.80 3(51) C 07 C 103/52
(21) WP C 07 C / 209 863 (22) 18.12.78

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für
Wirkstoffforschung, Berlin, DD

(72) Henklein, Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Niedrich, Hartmut, Prof.
Dr. Dipl.-Chem.; Halatsch, Wolf-Rainer, Dr. Dipl.-Chem.;
Walz, Harry, Dr. Dipl.-Chem.; Bilk, Lothar, Dr. Dipl.-Chem.,
DD

siehe (72)

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für
Molekularbiologie und Medizin, AG Patent- und Neuererwesen,
1115 Berlin, Lindenberger Weg 70

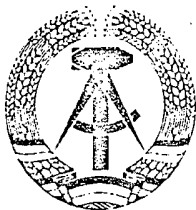
(54) Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden der Formel I, welche biologisch aktiv sind und Vorstufen zur Herstellung pharmazeutisch nutzbarer Analoga des Angiotensin II darstellen. Die Erfindung hat das Ziel, Peptide der angegebenen Formel mit hohen Ausbeuten unter Vermeidung aufwendiger Reinigungsoperationen zu gewinnen. Erfindungsgemäß wird das geschützte Oktapeptid aus zwei Tetrapeptiden Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH (1-4) und X-His-Pro-Y-ONb (5-8) hergestellt. Das hierfür erforderliche Tetrapeptid Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH erhält man durch Kondensation von Z-Sar-OH mit DCCI unter Zusatz von HONb bzw. des entstehenden aktivierten Esters Z-Sar-ONb, der nach Isolierung oder in situ mit dem H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH-Hydrobromid umgesetzt wird, unter Zusatz von mindestens 2 Mol eines tertiären Amins, vorzugsweise 3 Mol Triäthylamin. Das Tetrapeptid läßt sich in guter Reinheit durch Umkristallisieren aus Isopropanol erhalten. Das geschützte Tetrapeptid X-His-Pro-Y-ONb wird in bekannter Weise hergestellt. Die so erhaltenen Tetrapeptide werden nach Zusatz von N-Äthylmorpholin zum geschützten Sarcosylheptapeptid in der Weise umgesetzt, daß das Sarcosyltripeptid und die Kondensationsmittel in 10- bis 20%igem Überschuß eingesetzt werden und das entstandene Oktapeptid nacheinander aus Isopropanol und Methanol umkristallisiert wird.

Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-X-His-Pro-Y-ONb, I

X = Val oder Ile

Y = Ile, Ala, Leu, Thr(OMe) oder Thr



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 140 877

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 140 877 (44) 02.04.80 3(51) C 07 C 103/52
(21) WP C 07 C / 209 863 (22) 18.12.78

- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für
Wirkstoffforschung, Berlin, DD
- (72) Henklein, Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Niedrich, Hartmut, Prof.
Dr. Dipl.-Chem.; Halatsch, Wolf-Rainer, Dr. Dipl.-Chem.;
Walz, Harry, Dr. Dipl.-Chem.; Bilk, Lothar, Dr. Dipl.-Chem.,
DD

Zur PS Nr. *140.877*...

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise *bestätigt* aufgehoben gem. § *18* Abs. 1 d. Änd. Ges. z. Pat. Ges.)

- (54) Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden.

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden der Formel I, welche biologisch aktiv sind und Vorstufen zur Herstellung pharmazeutisch nutzbarer Analoga des Angiotensin II darstellen. Die Erfindung hat das Ziel, Peptide der angegebenen Formel mit hohen Ausbeuten unter Vermeidung aufwendiger Reinigungsoperationen zu gewinnen. Erfindungsgemäß wird das geschützte Oktapeptid aus zwei Tetrapeptiden Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH (1-4) und X-His-Pro-Y-ONb (5-8) hergestellt. Das hierfür erforderliche Tetrapeptid Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH erhält man durch Kondensation von Z-Sar-OH mit DCCI unter Zusatz von HONb bzw. des entstehenden aktivierten Esters Z-Sar-ONb, der nach Isolierung oder in situ mit dem H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH-Hydrobromid umgesetzt wird, unter Zusatz von mindestens 2 Mol eines tertiären Amins, vorzugsweise 3 Mol Triäthylamin. Das Tetrapeptid läßt sich in guter Reinheit durch Umkristallisieren aus Isopropanol erhalten. Das geschützte Tetrapeptid X-His-Pro-Y-ONb wird in bekannter Weise hergestellt. Die so erhaltenen Tetrapeptide werden nach Zusatz von N-Äthylmorpholin zum geschützten Sarcosylheptapeptid in der Weise umgesetzt, daß das Sarcosyltri-peptid und die Kondensationsmittel in 10- bis 20%igem Überschuß eingesetzt werden und das entstandene Oktapeptid nacheinander aus Isopropanol und Methanol umkristallisiert wird.

Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-X-His-Pro-Y-ONb, I

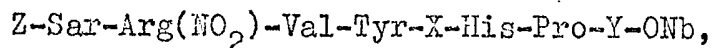
X = Val oder Ile

Y = Ile, Ala, Leu, Thr(OMe) oder Thr

Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sarcosylheptapeptiden der Formel I



in der X = Val oder Ile

und Y = eine neutrale hydrophobe Aminosäure wie Ile, Ala, Leu, Thr(OMe) oder Thr

bedeuten.

Diese Verbindungen stellen Vorstufen zur Herstellung pharmazeutisch nutzbarer Analoge des Angiotensin II dar.

Anwendungsgebiet für die Erfindung ist die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung und die biologische Wirksamkeit von Hepta- und Oktapeptiden mit dem Angiotensin II verwandter Struktur zur Gewinnung von Antagonisten ist bereits mehrfach beschrieben worden. So werden z.B. nach der DOS212 73 93 derartige Peptide durch stufenweise Kondensation am festen Träger hergestellt. Dieses Verfahren besitzt einige Nachteile. Bei

- a) hohem Risiko für größere Ansätze ist
- b) ein sehr großer Reinigungsaufwand erforderlich, um die für klinische Untersuchungen stehenden Anforderungen an Standardisierung zu erfüllen.

Bei Verfahren mit Kondensation von Fragmenten, wie in Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 357, Seite 825-828 und 355, Seite 1083-1096 und in der DOS 23 23 322 und DOS 24 57 463 beschrieben sind, verlaufen wichtige Synthesestufen mit geringer Ausbeute, z.B. bei der Darstellung von Z-Arg(Z)₂-Val-Tyr(Bu^t)-Val-His-Pro-Ala-OBu^t.

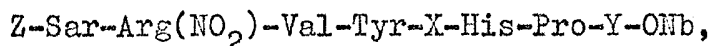
Das schrittweise Anknüpfen der N-terminalen Aminosäuren ist bei diesen Verfahren hinsichtlich Reinheit der erhaltenen Produkte und Ausbeute nach der Reinigung nicht optimal.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, geschützte Oktapeptide der allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute unter Vermeidung aufwendiger Reinigungsoperationen in für die Weiterverarbeitung genügend reiner Form darzustellen. Es wird insbesondere angestrebt, daß die Entfernung der Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung als die in der Peptidsynthese vorteilhafteste Abspaltungsreaktion erfolgen kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden Sarcosylheptapeptide der allgemeinen Formel I



in der X = Val oder Ile

und Y = eine neutrale hydrophobe Aminosäure wie Ile, Ala, Leu, Thr(OMe) oder Thr

bedeuten,

durch Kondensation von Z-Sarcosin an H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und anschließender Kondensation mit X-His-Pro-Y-ONb, wobei X und Y die o.g. Bedeutung haben, jeweils unter Zusatz von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) und N-Hydroxynorbornen-2,3-dicarbonsäureimid (HONB) und in Gegenwart von mindestens 2 Mol tertiärem Amin hergestellt.

Die Herstellung des Z-Sarcosyltripeptides erfolgt, indem man Z-Sarcosin in THF/Dioxan-Gemischen mit HONB/DCCI zum aktivierten Ester Z-Sar-ONb umsetzt. Dieser aktivierte Ester, der entweder nach Abtrennen des Dicyclohexyl (DCH)-Harnstoffs durch Einrotieren des Lösungsmittelgemisches isoliert oder ohne weitere Isolierung eingesetzt wird, reagiert mit dem Tripeptid H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH-Hydrobromid in Gegenwart von vorzugsweise 3 Mol Triäthylamin zum Tetrapeptid. Nach Umkristallisation aus Isopropanol wird das Z-Sarcosyltripeptid Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH in 10-20%igem Überschuß unter Zusatz von vorzugsweise 3 Mol N-Äthylmorpholin mit dem Tetrapeptid X-His-Pro-Y-ONb, welches in bekannter Weise hergestellt wird, umgesetzt. Nach Abtrennen des entstehenden Dicyclohexyl-Harnstoffs und des überwiegenden Anteils des Amin-Hydrobromids werden überschüssiges Z-Sarcosyltripeptid und Restharnstoff nach üblicher Aufarbeitung durch Umkristallisation des Oktapeptids aus Isopropanol und anschließendes nochmaliges Umfällen aus Methanol quantitativ entfernt.

Infolge der Verwendung des Nitrobenzyl-Schutzes besteht ein Vorteil des Verfahrens in der Möglichkeit der gleichzeitigen Abspaltung aller Schutzgruppen, die nahezu quantitativ in Gegenwart von 5% Pd/BaSO₄ in Eisessig/Methanol/Wasser-Gemischen gelingt.

Das erhaltene Produkt besitzt bereits einen hohen Reinheitsgrad und kann durch Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose weiter aufgereinigt werden.

Aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf eine durch Angiotensin II hervorgerufene Erhöhung des Blutdrucks sind diese Peptide wirksame Mittel, um einer durch Angiotensin II verursachten Hypertension entgegen zu wirken. Das Verfahren ist auch geeignet zur Herstellung von Peptiden, die wie Angiotensin II hypertensiv wirken, was von der Wahl der C-terminalen Aminosäure abhängt.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren an Beispielen erläutert.

Beispiel 1 : Z-Sarcosyl-nitroarginyl-valyl-tyrosin

4,46 g (20 mMol) Z-Sarcosin werden zusammen mit 20 mMol HONB (3,58 g) in einem Gemisch aus 30 ml Dioxan und 20ml Tetrahydrofuran gelöst. Danach wird abgekühlt und bei 0 bis + 2°C DCCI dazugegeben. Die Temperatur wird 30 min bei 0 bis + 2°C gehalten. Es wird anschließend noch eine Stunde bei Raumtemperatur weitergerührt. Der ausfallende Dicyclohexyl-Harnstoff wird abgesaugt, das Filtrat eingeeengt. Der rohe Z-Sarcosyl-ONB-ester kann nun entweder nach Umfällen aus Essigester/Hexan isoliert werden (Fp. 82-84°C) oder sofort weiter in situ umgesetzt werden.

Der Rückstand wird in 15 ml DMF aufgenommen und mit einer Lösung von 10,8 g (16 mMol) H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH · 1,2 HBr (HBr-Gehalt wird vorher durch Titration bestimmt) und 5,36 ml Triäthylamin in 50 ml DMF (ausfallendes NEt₃ · HBr bleibt unberücksichtigt) vereinigt. Es wird 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung färbt sich während dieser Zeit gelblich. Das Lösungsmittel wird bei 40°C im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand zuerst mit Essigester (20 ml) und dann mit 40 ml 2 n HCl verrieben. Anschließend rührt man den inzwischen pulverig gewordenen Rückstand noch mit 5% NaHCO₃ und schließlich mit Wasser aus. Es wird getrocknet und 2 mal aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 10,6 g (83%)

Fp. 139-140°C

$$[\alpha]_D^{20} = -2,2 \quad (c = 1, \text{DMF})$$

R_f-Wert: 0,82 n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 4 : 1

Beispiel 2 : Z-Sarcosyl-nitroarginyl-valyl-tyrosyl-valyl-histidyl-prolyl-alanin-nitrobenzylester

5,47 g (7,6 mMol) H-Val-His-Pro-Ala-ONb · 2 HBr und 5,3 g (7,6 mMol + 10%) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH werden zusammen mit 1,5 g (7,6 mMol + 10%) HONB in 40 ml absol. DMF gelöst. Es wird auf -10°C abgekühlt, 2,8 ml NÄM hinzugefügt, 1,8 g DCCI gelöst in 10 ml DMF addiert, 2 Stunden bei dieser Temperatur gehalten und anschließend noch 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit trockenem Äther verrieben. Danach wird nacheinander mit 5% NaHCO₃, 5% KHSO₄ und Wasser verrieben. Nach dem Trocknen wird aus Isopropanol und anschließend noch einmal aus absol. Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 6,6 g (71%) nach Umkristallisation F_p. 215-217°C

$$[\alpha]_D^{22} = -36,6 \quad (c = 1, \text{DMF})$$

R_f-Wert: 0,35 n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1

R_f-Wert: 0,81 sec. Butanol/ 3% Ammoniak 100 : 44

Beispiel 3 : Sarcosyl-arginyl-valyl-tyrosyl-valyl-histidyl-prolyl-alanin

3 g des geschützten Oktapeptides, nach Beispiel 2 hergestellt, werden mit 2 g Pd/BaSO₄ (5%) in 45 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 3 : 3 : 1 hydriert. Nach 48 h wird ein weiteres Gramm Katalysator zugefügt. Nach maximal 96 h ist die Hydrierung beendet. Der Katalysator wird abzentrifugiert und mehrfach gewaschen. Die vereinigten Zentrifugate und Waschlösungen werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das Produkt nach Auflösen in wenig Methanol mit Äther ausgefällt.

Ausbeute: 2,4 g

F_p. > 200 unter Zersetzung

$[\alpha]_D^{20} = -79,8$ (c = 0,5, 1 n Eisessig)

Beispiel 4 : Z-Sarcosyl-nitroarginyl-valyl-tyrosyl-valyl-histidyl-prolyl-isoleucin-nitrobenzylester

2g (2,51 mMol) H-Val-His-Pro-Ile-ONb 2HBr, hergestellt aus Z-Val-His-NH-NH₂ und H-Pro-Ile-ONb durch Azid-Synthese und Entfernen der Schutzgruppe, und 1,97 g (2,8 mMol) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH werden zusammen mit 495 mg (2,8 mMol) HONB in 25 ml DMF gelöst. Es wird auf -10°C abgekühlt, 0,78 ml (6,2 mMol) NÄM hinzugefügt, 576 mg (2,8 mMol) DCCI gelöst in 3 ml DMF addiert, 2 Stunden bei dieser Temperatur gehalten und anschließend noch 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit trockenem Äther verrieben. Danach wird nacheinander mit 5% NaHCO₃, 5% KHSO₄ und Wasser verrieben. Nach dem Trocknen wird aus Isopropanol und anschließend aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,8 g (77%)

F_p 202-205°C

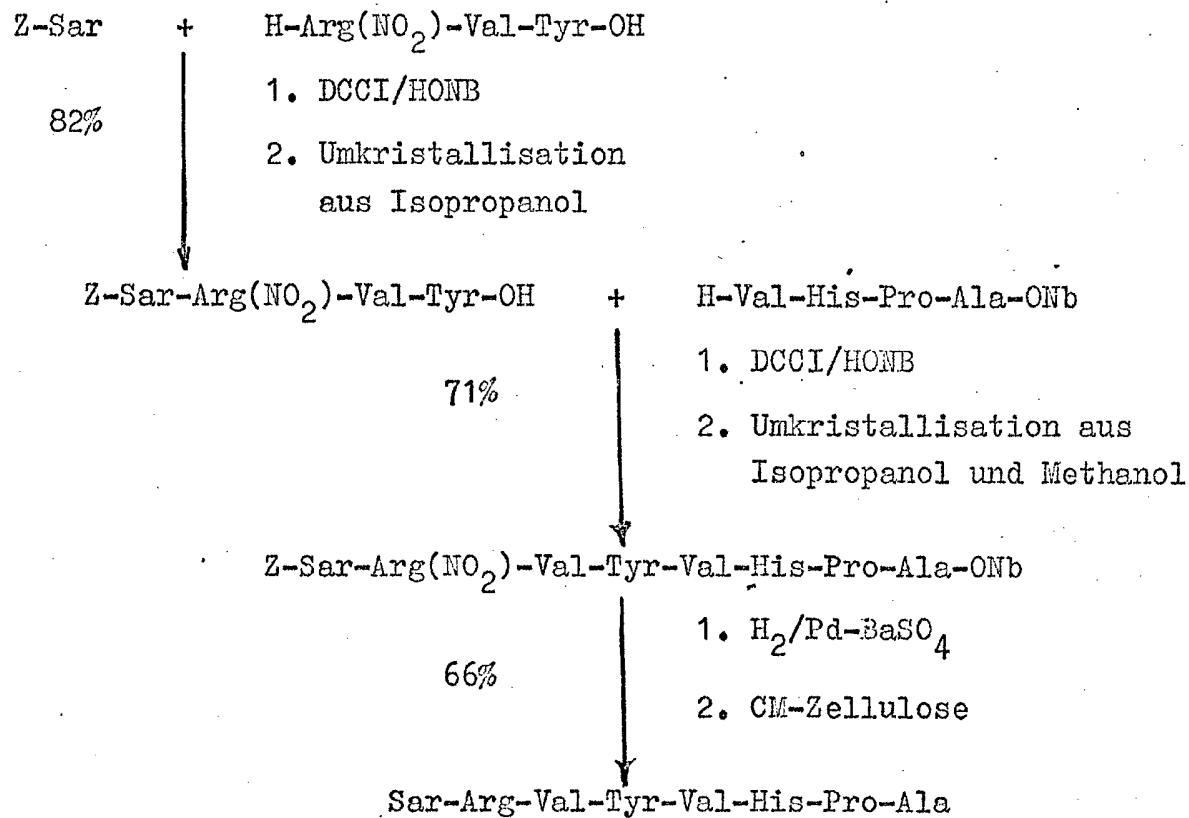
$[\alpha]_D^{22} = -24,4$ (c = 1, DMF)

R_f-Wert: 0,685 n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

R_f-Wert: 0,94 n-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 9:2:6:7

R_f-Wert: 0,57 sec. Butanol/ 3% NH₃ 100:44

F o r m e l s c h e m a

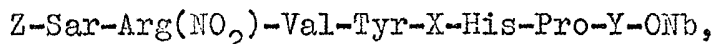


Verwendete Abkürzungen

Z-	=	Benzylcarbonyl
-ONb	=	p-Nitrobenzylester
HONB	=	N-Hydroxy-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid
DCCI	=	Dicyclohexylcarbodiimid
Sar	=	Sarcosin (N-Methylglycin)
Val	=	Valin
Tyr	=	Tyrosin
Arg(NO ₂)	=	g-Nitroarginin
Arg	=	Arginin
His	=	Histidin
Ala	=	Alanin
Ile	=	Isoleucin
Leu	=	Leucin
Pro	=	Prolin
Thr	=	Threonin
NÄM	=	N-Äthylmorpholin
DMF	=	N-Dimethylformamid
OBu ^t	=	t-Butylester
Bu ^t	=	t-Butyläther

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Peptiden der allgemeinen Formel I



in denen X = Val oder Ile

und Y = eine neutrale hydrophobe Aminosäure wie
Ile, Ala, Leu, Thr(OMe) oder Thr

darstellt,

dadurch gekennzeichnet, daß Z-Sarcosin an H-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH, und das entstandene Z-Sarcosyltripeptid an X-His-Pro-Y-ONb kondensiert wird, jeweils unter Zusatz

von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) und N-Hydroxy-norbornen-2, 2,3-dicarbonylsäureimid (HONB) und in Gegenwart von mindestens 2 Mol eines tertiären Amins und anschließend das erhaltene Oktapeptid I nacheinander aus Isopropanol und Methanol umkristallisiert wird.

2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß Z-Sar in THF/Dioxan in den aktivierten Ester überführt wird, der nach Isolierung oder in situ mit Arg(NO₂)-Val-Tyr-Hydrobromid unter Zusatz von vorzugsweise 3 Mol Triäthylamin umgesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß das Z-Sarcosyltripeptid Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr-OH und die Kondensationsmittel in 10-20% Überschuß eingesetzt werden, unter Zusatz von vorzugsweise 3 Mol N-Äthylmorpholin.