

A2

**DEMANDE  
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

②①

**N° 80 11230**

Se référant : au brevet d'invention n° 79 16843 du 29 juin 1979.

---

⑤④ Nouveaux dipeptides, leur préparation et les médicaments qui les contiennent.

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

②② Date de dépôt..... 20 mai 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 48 du 27-11-1981.

---

⑦① Déposant : RHONE-POULENC INDUSTRIES, société anonyme, résidant en France.

⑦② Invention de : Jean Bouchaudon, Daniel Farge et Claude James.

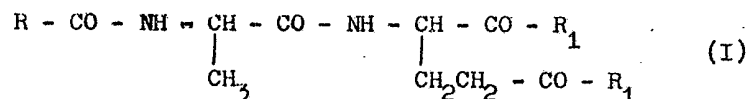
⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire :

---

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

Dans le brevet principal ont été décrits de nouveaux dipeptides de formule générale :



éventuellement leurs sels non toxiques, leur préparation et les médicaments qui les contiennent.

Dans la formule générale (I),

R - CO représente un reste d'acide gras et les symboles R<sub>1</sub>, identiques ou différents, représentent un radical hydroxy ou amino ou un radical alcoyloxy contenant de 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle ou nitrophényle, étant entendu que l'alanine [NH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)COOH] est sous forme L et que l'acide glutamique [NH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)COOH] ou ses dérivés (amides, esters) sont sous forme D.

Dans le reste d'acide gras R-CO, R représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant de 1 à 44 atomes de carbone (éventuellement substitué par un radical hydroxy, phényle ou cyclohexyle), un radical alcényle contenant de 2 à 29 atomes de carbone et pouvant contenir plus d'une double liaison, ou un reste d'acide mycolique tel que rencontré dans la structure de la paroi bactérienne des mycobactéries, de Nocardia ou de corynébactéries.

Les nouveaux produits de formule générale (I) sont particulièrement utiles comme adjuvants immunologiques et comme immunostimulants.

La présente addition a pour objet un procédé de préparation des produits de formule générale (I) dans laquelle les symboles R<sub>1</sub>, identiques ou différents, représentent un radical hydroxy ou amino, l'un au moins étant un radical hydroxy et R est défini comme précédemment, par synthèse peptidique de Merrifield en phase solide.

Selon la présente addition, les produits de formule générale (I) peuvent être obtenus en réalisant la succession des phases suivantes :

1) fixation du groupement α- ou γ-carboxylique de l'acide D glutamique dont la fonction amine est protégée et dont la fonction γ- ou α-carboxylique, selon le cas, est protégée sous forme d'amide ou d'ester, sur

un support approprié,

- 2) élimination du groupement protecteur de la fonction amine sans toucher à la liaison acide glutamique-support et, éventuellement, à la fonction ester du deuxième groupement carboxylique de l'acide D glutamique,
- 5 3) condensation de la L alanine, dont la fonction amine est protégée par un groupement protecteur convenable, sur l'acide D glutamique fixé sur son support,
- 4) élimination du groupement protecteur de la fonction amine du reste L-alanyle sans toucher à la liaison acide D glutamique-support et, éventuellement, à la fonction ester du deuxième groupement carboxylique de l'acide D glutamique,
- 10 5) condensation de l'acide gras sur le dipeptide-support obtenu,
- 6) coupure de la liaison acide D glutamique-support avec éventuellement élimination du groupement protecteur de la fonction  $\alpha$ - ou  $\gamma$ -carboxylique de l'acide glutamique, et
- 15 7) séparation du dipeptide de formule générale (I) ainsi obtenu.

Les supports qui conviennent particulièrement bien sont les copolymères styrène-divinylbenzène chlorométhylés ou hydroxyméthylés. De préférence, les copolymères styrène-divinylbenzène (98-2 ou 99-1) chlorométhylés sont utilisés.

20

La fixation de l'acide D glutamique convenablement protégé sur le support chlorométhylé s'effectue selon les méthodes habituelles en faisant réagir l'acide aminé, en solution dans un solvant organique tel que l'éthanol, sur la résine en présence d'une base organique telle que la triéthylamine. Il est particulièrement avantageux de chauffer le mélange réactionnel jusqu'à une température voisine de la température d'ébullition du solvant.

25

Les groupements protecteurs de la fonction amine et, éventuellement, d'une des fonctions acides de l'acide D glutamique doivent être choisis de telle manière que l'élimination du groupement protecteur de la fonction amine s'effectue sans toucher ni à la liaison aminoacide-support ni au groupement protecteur de la fonction acide.

30

Généralement, la fonction acide de l'acide D-glutamique qui doit être protégée, est sous la forme d'ester benzylique qui s'élimine en milieu acide au moyen, par exemple, d'un mélange acide bromhydrique-acide trifluoroacétique anhydre et le groupement protecteur de la fonction amine est le radical t-butyloxycarbonyle qui s'élimine, par exemple, au moyen d'un mélange acide trifluoroacétique-chlorure de méthylène.

La L alanine, dont la fonction amine est protégée, de préférence par un groupement t-butyloxycarbonyle, est condensée sur l'acide D glutamique-support selon les méthodes habituelles utilisées en chimie peptidique.

Généralement la réaction est effectuée en présence d'un agent de condensation tel que le dicyclohexylcarbodiimide, dans un solvant organique tel que le chlorure de méthylène.

L'élimination du groupement protecteur de la fonction amine du reste L-alanyle s'effectue dans les conditions indiquées précédemment pour l'élimination du groupement protecteur de la fonction amine de l'acide D glutamique.

L'acide gras est condensé sur le dipeptide-support ainsi obtenu selon les méthodes habituelles et en particulier selon celle qui est indiquée précédemment pour la condensation de la L alanine sur l'acide D glutamique-support.

La coupure de la liaison acide D glutamique-support, qui est de nature ester benzylique, et éventuellement l'élimination du groupement protecteur de la fonction carboxylique de l'acide D glutamique sont généralement effectuées simultanément. De préférence on utilise un mélange acide bromhydrique-acide trifluoroacétique anhydre.

Le produit de formule générale (I) est séparé du mélange réactionnel selon les méthodes habituelles. Le support est séparé par filtration et le dipeptide de formule générale (I) est séparé du filtrat après concentration à sec et après purification selon les méthodes physico-chimiques.

Selon une variante du procédé de la présente addition, il est possible de condenser sur l'acide D glutamique-support la L-alanine dont la fonction amine est protégée par un reste d'acide gras tel que défini précédemment. Dans ces conditions, la condensation de la L-alanine sur l'acide D glutamique-support conduit directement au produit de formule générale (I) qui est séparé après coupure de la liaison acide D glutamique-support, et élimination éventuelle du groupement protecteur de la fonction acide de l'acide D glutamique.

Selon une variante du procédé de la présente addition, il est possible de fixer sur le support approprié le dipeptide provenant de la condensation de la L alanine sur l'acide D glutamique, puis de condenser l'acide gras sur le dipeptide ainsi fixé et enfin séparer le produit obtenu. Lors de la fixation du dipeptide sur le support, il est nécessaire de protéger la fonction amine du reste L alanyle et éventuellement la fonction  $\alpha$ -acide de l'acide D glutamique en utilisant de préférence les groupements protecteurs indiqués précédemment. Dans ces conditions, la condensation de l'acide gras sur le dipeptide fixé sur son support, dont le groupement protecteur de la fonction amine a été éliminé, conduit directement au produit de formule générale (I) qui est séparé après coupure de la liaison acide D glutamique-support et élimination éventuelle du groupement protecteur de la fonction acide de l'acide D glutamique.

Les dipeptides de formule générale (I) obtenus selon le procédé de la présente addition peuvent être éventuellement purifiés par des méthodes physiques telles que la cristallisation ou la chromatographie et être transformés en sels métalliques ou en sels d'addition avec les bases azotées.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif montrent comment l'invention peut être mise en pratique. Les produits obtenus peuvent former des complexes avec les métaux alcalins ou alcalino-terreux; il en résulte que les résultats de l'analyse élémentaire peuvent sensiblement s'écarter des valeurs théoriques. Cependant la structure des produits est confirmée par le rapport C/N qui est en accord avec la théorie, par la teneur en aminoacides et par leur homogénéité en chromatographie sur couche mince de silicagel.

Exemple 1 -

A une solution de 6,07 g de N-t-butyloxy-carbonyl  $\alpha$ -D glutamate de benzyle dans 70 cm<sup>3</sup> d'éthanol, on ajoute 12,5 g de copolymère styrène-divinylbenzène (98-2) chlorométhylé contenant 1,2 milliéquivalent de chlore par gramme. On agite le mélange réactionnel pendant 1/4 heure à 28°C. On ajoute alors 2,25 cm<sup>3</sup> de triéthylamine et on agite le mélange réactionnel pendant 65 heures à 78°C. Le polymère est filtré, lavé successivement par 3 fois 300 cm<sup>3</sup> au total d'éthanol et 3 fois 300 cm<sup>3</sup> au total de chlorure de méthylène, puis séché sous pression réduite (20 mm de mercure) à 40°C. On obtient ainsi 17 g de O<sup>1</sup>-benzyl N-t.-butyloxy-carbonyl D glutamyl-polymère. L'alanine est condensée sur le O<sup>1</sup>-benzyl N-t.-butyloxy-carbonyl D glutamyl-polymère en effectuant la suite d'opérations suivantes dans un réacteur muni d'un agitateur et, à sa base, d'un filtre en verre fritté.

- 15 1) On effectue 3 lavages successifs du polymère par 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène à chaque fois. Chaque addition de solvant est suivie d'une agitation pendant 3 minutes, puis d'un essorage.
- 20 2) Le groupement protecteur t.-butyloxy-carbonyl de l'acide glutamique est ensuite éliminé par addition de 100 cm<sup>3</sup> d'un mélange acide trifluoroacétique-chlorure de méthylène (1/1 en volumes), puis agitation pendant 20 minutes et enfin essorage.
- 25 3) La résine est alors lavée successivement par :
  - a) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène,
  - b) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de méthanol,
  - 25 c) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylèneen agitant pendant 3 minutes après chaque addition de solvant et en essorant à chaque fois.
- 30 4) On neutralise alors le polymère par addition de 100 cm<sup>3</sup> d'un mélange chlorure de méthylène-N-méthylmorpholine (9/1 en volumes), agitation pendant 10 minutes puis essorage.
- 5) La résine est lavée ensuite par :
  - 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylèneen agitant pendant 3 minutes après chaque addition de solvant et en essorant à chaque fois.

c) On ajoute alors successivement :

a) 3,78 g de N-t.-butyloxycarbonyl L alanine en solution dans 50 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène et on agite pendant 10 minutes;

5 b) 4,13 g de dicyclohexylcarbodiimide en solution dans 50 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène, on agite pendant 20 heures et essore.

7) On lave la résine successivement par :

a) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène

b) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> d'acide acétique

c) 3 fois 100 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène

10 en agitant pendant 3 minutes après chaque addition de solvant et en essorant à chaque fois.

On obtient ainsi le O<sup>1</sup>-benzyl N-(t.-butyloxycarbonyl L alanyl)-D glutamyl-polymère.

15 L'acide heptadécanoïque est condensé sur le dipeptide-polymère en répétant les opérations 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. L'opération n°6 est modifiée comme suit :

On ajoute successivement :

a) 5,4 g d'acide heptadécanoïque en solution dans 50 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène et on agite pendant 10 minutes;

20 b) 4,13 g de dicyclohexylcarbodiimide en solution dans 50 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène, on agite pendant 20 heures et on essore.

On obtient ainsi le O<sup>1</sup>-benzyl-N-(N-heptadécanoyl L alanyl)-D glutamyl-polymère.

25 Ce polymère est mis en suspension dans 100 cm<sup>3</sup> d'acide trifluoroacétique contenu dans un réacteur muni d'un agitateur et, à sa base, d'un filtre en verre fritté. Dans cette suspension, on fait passer un courant d'acide bromhydrique pendant 90 minutes. Ensuite, on essore la résine et on la lave 3 fois par 300 cm<sup>3</sup> au total d'acide acétique en agitant pendant 3 minutes après chaque addition de l'acide acétique et en essorant à  
30 chaque fois. Les filtrats sont réunis et concentrés à sec sous pression réduite (20 mm de mercure) à 50°C.

Le résidu ainsi obtenu est mis en suspension dans 30 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, séparé par filtration, lavé 2 fois par 60 cm<sup>3</sup> au total d'éther et séché. On obtient ainsi 1,97 g de solide que l'on chromatographie sur  
35 une colonne de 2,2 cm de diamètre contenant 40 g de gel de silice neutre (0,04-0,063 mm).

On élue successivement par 350 cm<sup>3</sup> d'un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (1/1 en volumes), 400 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, 700 cm<sup>3</sup> d'un mélange acétate d'éthyle-acide acétique (95/5 en volumes), 950 cm<sup>3</sup> d'un mélange acétate d'éthyle-acide acétique (90/10 en volumes), 750 cm<sup>3</sup> d'un mélange acétate d'éthyle-acide acétique (80/20 en volumes) et 1,6 litre d'acide acétique en recueillant des fractions de 50 cm<sup>3</sup>. Les fractions 65 à 94 réunies, sont concentrées à sec sous pression réduite (20 mm de mercure) à 50°C. On obtient ainsi 0,88 g d'acide N-heptadécanoyl L alanyl-D glutamique.

10 Rf = 0,61 [silicagel; n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (50/20/6/24 en volumes)]

|         |   |                     |   |   |   |       |  |   |      |  |   |       |
|---------|---|---------------------|---|---|---|-------|--|---|------|--|---|-------|
| Analyse | : | calculé             | % | : | C | 63,80 |  | H | 9,85 |  | N | 5,95  |
|         |   | trouvé              | % | : |   | 60,1  |  |   | 9,3  |  |   | 5,8   |
|         |   | Cendres sulfuriques |   | : |   |       |  |   |      |  |   | 5,6 % |

15 Exemple 2 -

En opérant de la même manière et à partir de matières premières convenables, les produits suivants sont préparés :

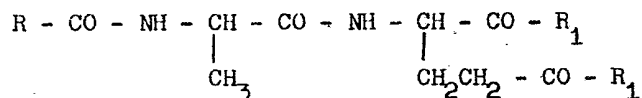
acide N-lauroyl L alanyl-D glutamique fondant à 138-142°C;

acide N-(phényl-5 valéryl)-L alanyl-D glutamique fondant entre 135 et 140°C (fusion pâteuse);

20 acide N-arachidonoyl L alanyl-D glutamique fondant vers 90°C (fusion pâteuse).

REVEN DICATIONS

1. Procédé de préparation de dipeptides de formule générale :



5 dans laquelle les symboles  $R_1$ , identiques ou différents, représentent un radical hydroxy ou amino, l'un au moins étant un radical hydroxy et R-CO- représente un reste d'acide gras dans lequel R est un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant de 1 à 44 atomes de carbone (éventuellement substitué par un radical hydroxy, phényle ou cyclohexyle), un radical alcényle contenant de 2 à 29 atomes de carbone et pouvant contenir plus d'une double liaison, ou un reste d'acide mycolique, étant entendu que 10 l'alanine est sous forme L et que l'acide glutamique est sous forme D, caractérisé en ce que l'on fixe sur un support approprié le groupement  $\alpha$ - ou  $\gamma$ -carboxylique de l'acide D glutamique dont la fonction amine est protégée et dont la fonction  $\gamma$ - ou  $\alpha$ -carboxylique selon le cas est protégée sous forme d'amide ou d'ester, élimine le groupement protecteur de 15 la fonction amine sans toucher à la liaison acide D glutamique-support, condense la L alanine dont la fonction amine est protégée sur l'acide D glutamique-support, puis éventuellement élimine le groupement protecteur de la fonction amine du reste L alanyle et condense l'acide gras sur le 20 dipeptide-support, coupe la liaison acide D glutamique-support et élimine le cas échéant le groupement protecteur de la fonction acide de l'acide D glutamique et isole le produit obtenu.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le support est un copolymère styrène-divinylbenzène chlorométhylé ou hydroxyméthylé. 25

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le groupement protecteur de la fonction amine de l'acide D-glutamique est le radical t.-butyloxycarbonyle et que la fonction  $\alpha$ -acide de l'acide D glutamique est protégée sous forme d'amide ou d'ester benzylique.

4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que, le groupement protecteur de la fonction amine de la L-alanine étant le radical t.-butyloxycarbonyle, on élimine ce groupement protecteur puis condense l'acide gras et isole le produit obtenu.

5  
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que, la fonction amine de la L-alanine étant protégée par un reste d'acide gras, on condense la L-alanine ainsi protégée puis on isole le dipeptide obtenu.

10  
6. Procédé de préparation d'un dipeptide tel qu'il est défini dans la revendication 1 caractérisé en ce que l'on fixe sur un support approprié le dipeptide provenant de la condensation de la L-alanine sur l'acide D glutamique puis on condense l'acide gras sur le dipeptide ainsi fixé et on isole le produit obtenu.