



NORGE

[NO]

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 134296

(51) Int. Cl.² C 07 C 103/52

(21) Patensøknad nr. 2010/71

(22) Inngitt 27.05.71

(23) Løpedag 27.05.71

(41) Alment tilgjengelig fra 07.12.71

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 08.06.76

(30) Prioritet begjært 04.06.70, 12.02.71, USA, nr. 43595, 115045

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av nye, terapeutisk virksomme hepta- og oktapeptider.

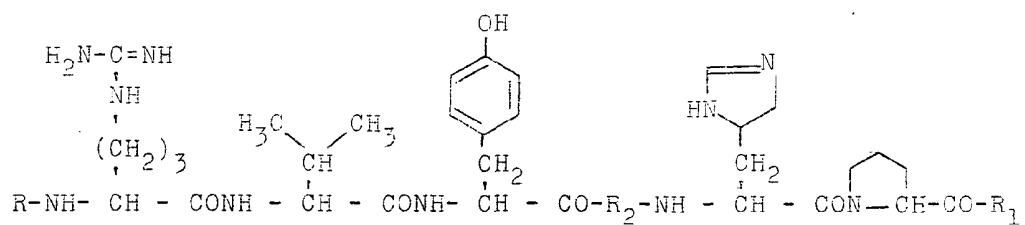
(71)(73) Søker/Patenthaver THE NORWICH PHARMACAL COMPANY,
(a Corporation of Delaware),
17 Eaton Avenue, Norwich, N.Y.13815,
USA.

(72) Oppfinner FRANK SIPOS, East Brunswick, N.J.,
DONALD THEODORE PALS, Oxford, N.Y.,
GEORGE SMITH DENNING, Norwich, N.Y.,
USA.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstilling av nye, farmakologisk virksomme hepta- og oktapeptider med formelen:



hvor R betyr hydrogen, succinyl, L-aspartyl, sarkosyl, L-seryl, succinamyl, L-prolyl, glycyl eller D- eller L-asparaginyll, R_1 betyr en L-

134296

alanin-, L- eller D-leucin-, glycin-, L-isoleucin- eller β -alaninrest og R_2 betyr L-valyl, L-isoleucyl eller L-alanyl.

De ifølge oppfinnelsen fremstilte forbindelser har farmakologisk virkning. De kan inhibere pressoreffekten av angiotensinamid på blodtrykket. Når de således administreres ved intravenøs infusjon til levende rotter i såpass liten mengde som 20 mikrogram/kg/minutt, inhiberes pressoreffekten for angiotensinamid som administreres på lignende måte. På grunn av denne inhiberende egenskap på en blodtrykksforhøyelse forårsaket av angiotensinamid, er de ovennevnte peptider verdifulle midler for å motvirke hypertensjon som skriver seg fra angiotensinamid. De kan også inhibere hypertensjon hos rotter med akutt ensidig nyrehypertensjon etter intravenøs infusjon.

Fremgangsmåten til fremstilling av de nye, farmakologisk virksomme polypeptidene med den ovenfor angitte formel, er kjennetegnet ved at man med anvendelse av innen peptidkjemien vanlige metoder, trinnvis sammenkobler syrene HR_1 , prolin, histidin, R_2 -OH, tyrosin, valin, arginin og idet tilfelle R ikke er hydrogen, også syren ROH, hvor R_1 og R_2 og R har de ovenfor angitte betydninger, for dannelselse av amidbindinger mellom syrene, hvorved amino- og karboksylgrupper som man ikke ønsker skal delta i reaksjonen, på i og for seg kjent måte maskeres temporært med en beskyttelsesgruppe eller på annen kjent måte hindres i å delta i reaksjonen.

Hepta- og oktapeptidene fremstilles således på enkel måte under anvendelse av kjente metoder for fremstilling av peptider. Slike metoder innebærer oppbygning av en lineær kjede av aminosyrer ved gjentatte amidbindinger, hvorved man ved den resulterende kjededannelse anvender de nødvendige beskyttelsesgruppene som er mottagelige for en hurtig fjerning ved hjelp av vanlige avspaltningsmetoder. Anvendelsen av slike metoder på den ovennevnte peptider vil i det følgende beskrives under henvisning til følgende utførelseseksempel. L-asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-L-alanin:

BOC-Asn-Arg(NO_2)-Val-Tyr(O-Bzl)-Val-His(N^{im} -Bzl)-Pro-Ala-polymer (A)

BOC-Ala-harpiksester (5 g, 0.5 mmol/g) ble plasert i en 200 ml Merrifield reaksjonsbeholder av vuggende type. Harpiksen ble svellet i kloroform (analysekvalitet) ved vugging i 20 minutter og ble deretter vasket med tre 50 ml porsjoner iseddik. Tiden for hver vaskeoperasjon var 3 - 5 minutter. t-butoksykarbonyl-beskyttelsesgruppen (BOC) ble fjernet med 1 N HCl i vannfri eddiksyre ved vugging

i 40 minutter. Harpiksen ble vasket tre ganger og i samme rekkefølge med eddiksyre, absolutt etanol og N,N-dimetylformamid. Det oppnådde hydroklorid av alanylharpikester ble nøytralisert med en 10prosentig oppløsning av trietylamin i dimetylformamid ved vugging i 10 minutter. Deretter ble harpiksen vasket med tre porsjoner av hver av dimetylformamid, absolutt etanol, kloroform og metylenklorid og en oppløsning på 8.5 mmol (trefoldig overskudd) av BOC-prolin i 40 ml metylenklorid ble tilsatt. Deretter ble det foretatt en vugging av reaksjonsbeholderen i 20 minutter for å gi aminosyrederivatet tilstrekkelig tid til å gjennomtrengte harpiksen. Deretter ble 8.5 mmol N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (DDC) i 10 ml metylenklorid tilsatt og koblingen fikk foregå i 12 timer under vugging. Deretter ble harpiksen vasket med tre porsjoner av hver av metylenklorid, absolutt etanol og eddiksyre og var således ferdig for neste fjerningsoperasjon av beskyttelsesgrupper med HCl i eddiksyre som beskrevet ovenfor. Vasking, nøytraliseringen og koblingstrinnene ble utført ifølge den beskrevne metode under anvendelse av BOC-His(N^{im}-Bzl)-OH, BOC-Val-OH, BOC-Tyr(O-Bzl)-OH og BOC-Arg(NO₂)-OH. Det ble foretatt en forandring ved koblingstrinnene for BOC-His(N^{im}-Bzl)-OH og BOC-Arg(NO₂)-OH, og i disse tilfeller ble det som oppløsningsmiddel benyttet en dimetylformamid/metylenklorid-blanding (2:1). Koblingen av Asn til harpiksheptapeptidet hvorfra de beskyttende grupper var fjernet ble utført under anvendelse av BOC-Asn-ONP (BOC-Asparagin-p-nitrofenylester) i dimetylformamid ved å vugge blandingen i 72 timer.

Etter det siste koblingstrinnet ble harpikspeptidet vasket med dimetylformamid, etanol, eddiksyre og etanol og tørket i vakuum over P₂O₅. Harpikspeptidets vekt var 7.3 g.

H-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(O-Bzl)-Val-His(N^{im}-Bzl)-Pro-Ala-OH.2HBr (B)

Harpikspeptidet (A) (7.3 g) fremstilt som beskrevet ovenfor, ble suspendert i 25 ml tørr trifluoreddiksyre og en strøm av tørr HBr ble ført gjennom oppløsningen med liten hastighet. Etter 20 minutter ble harpiksen frafiltrert og behandlet ytterligere en gang med HBr/CF₃COOH i 40 minutter. Filtratet ble inndampet til tørrhet i vakuum ved 20°C, de oljeaktige restene ble utfelt med absolutt eter og produktet tørket i en eksikator over kaliumhydroksyd. Totalutbyttet var 1980 mg (59.8 %) av det beskyttede oktapeptidhydrobromidet.

H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH (C)

Det beskyttede peptid (B) (1.0 g) ble oppløst i 20 ml av en eddiksyre/dioksan/vann-blanding (4:4:1, v/v) og ble hydrogenolysert

134296

4

over Pd/BaSO₄ (10 % katalysator (0.5 g)) i 48 timer ved atmosfæretrykk. Deretter ble det tilsatt en ny porsjon (0.2 g) katalysator og hydrogeneringen ble fortsatt i 24 timer. Den filtrerte og fortynnete oppløsningen ble lyofilisert. Utbyttet var 750 mg (smp. 150° - 165°C). (Beregnet for dihydrobromid: 15.32 % Br. Funnet: 13.36 % Br).

Det urene produkt ble renset ved gelfiltreringskromatografi på "Sephadex G-25" i 0.2 M eddiksyre. De fraksjoner som inneholdt det rene peptid ble kombinert og lyofilisert. Den rensede forbindelse inneholdt bare spor av halogen.

TLC: Merck cellulose-F-plater, n-butanol/eddiksyre/vann-oppløsningsmiddelsystem (6:2:3 v/v), R_f 0.35. Merck silisiumdioksydgel F-254-plater med samme oppløsningsmiddelsystem, R_f 0.13.

$[\alpha]_D^{20} = -59.4^\circ$ (c = 0.2, 1 N AcOH) $[\alpha]_{578}^{20} = -61.1^\circ$ (c = 0.2, 1 N AcOH)

Aminosyreanalyse:

Ala: 1.00; Arg: 1.00; Asn: 1.09; His: 0.90; Pro: 1.04;

Tyr: 0.75; Val: 1.94.

På lignende måte ble andre peptider fremstilt ifølge oppfinnelsen ved å innføre den nødvendige enhet på et egnet stadium. De således fremstilte peptidene er angitt i nedenstående tabeller:

Tabell I

Peptid (Formel, molekylvekt)	Spesifikk vridning (Konsentrasjon og oppløsningsmiddel)	TLC på Merck silisiumdioksyd- gel-F-254-plater butanol/eddiksyre- vann (6:2:3 v/v); ninhydrin-detektering	TLC på Merck cellulose F-254- plater	R _f
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{23} = -81.33^\circ$ (c = 0.22, 1 N AcOH)		0.20	0.50
$[C_{43}H_{66}N_{14}O_{11}]$, mv 955.11				
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{23} = -70.55^\circ$ (c = 1, 1 N AcOH)		0.15	0.65
$[C_{46}H_{72}N_{14}O_{11}]$, mv 997.21				
H-asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Leu-OH	$[\alpha]_D^{26} = -87.32^\circ$ (c = 0.2, 1 N AcOH)		0.10	0.60
$[C_{46}H_{72}N_{14}O_{11}]$, mv 997.21				
Succinyl-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{23} = -64.90^\circ$ (c = 1, 1 N AcOH)	(Pauly's reagens)	0.40	0.70 (Pauly's reagens)
$[C_{43}H_{64}N_{12}O_{12}]$, mv 941.11				
H-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{23} = -101.62^\circ$ (c = 0.3, 1 N AcOH)		0.03	0.45
$[C_{43}H_{65}N_{13}O_{12}]$, mv 956.11				
H-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{24} = -68.31^\circ$ (c = 0.24, 1 N AcOH)		0.02	0.20
$[C_{39}H_{60}N_{12}O_9]$, mv 841.01				

134296

Tabell II

Peptid (Formel, molekylvekt)	Spesifikk vridning (Konsentrasjon og oppløsningsmiddel)	TLC på Merck silisiumdioksydgel-F- 254-plater (ninhhydrindetektering) butanol/eddiksyre/ vann (6:2:3 v/v)	butanol/eddik- syre/pyridin/vann (9:2:7:6 v/v)
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{23} = -84.41^\circ$	0.05	0.30
($C_{42}H_{65}N_{13}O_{10}$, mv 912.11)	(c = 0.24, 1 N AcOH)		
H-Ser-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{24} = -69.00^\circ$	0.02	0.38
($C_{42}H_{65}N_{13}O_{11}$, mv 928.11)	(c = 0.2, 1 N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-leu-OH	$[\alpha]_D^{19} = -54.40^\circ$	0.15	0.50
($C_{46}H_{72}N_{14}O_{11}$, mv 997.22)	(c = 0.25, 1 N AcOH)		
Succinamyl-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{21} = -83.14^\circ$	0.10	0.20
($C_{43}H_{65}N_{13}O_{11}$, mv 940.12)	(c = 0.25, 1 N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{23} = -54.90^\circ$	0.10	0.25
($C_{42}H_{64}N_{14}O_{11}$, mv 941.11)	(c = 1.0, 1 N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ile-OH	$[\alpha]_D^{17} = -55.33^\circ$	0.09	0.40
($C_{46}H_{72}N_{14}O_{11}$, mv 997.22)	(c = 0.3, 1 N AcOH)		

Tabell III

Peptid (formel, molekylvekt)	Spesifikk vridning (Konsentrasjon; løsningsmiddel)	TLC på Merck silisiumdioksydgel-F-254- plater (detektering med Pauly's reagens) butanol/eddiksyre/ vann (6:2:3 v/v)	butanol/eddiksyre/ vann/pyridin (9:2:6:7 v/v)
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{26} = -74.6^\circ$	0.15	0.25
($C_{41}H_{63}N_{13}O_{10}$, 898.10)	(c = 0.57, N AcOH)		
H-Pro-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{21} = -81.0^\circ$	0.10	0.35
($C_{43}H_{65}N_{13}O_{10}$, 924.12)	(c = 0.53, N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Gly-OH	$[\alpha]_D^{21} = -67.0^\circ$	0.15	0.32
($C_{42}H_{64}N_{14}O_{11}$, 941.11)	(c = 0.51, N AcOH)		
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-β-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -59.0^\circ$	0.05	0.25
($C_{42}H_{65}N_{13}O_{10}$, 912.10)	(c = 0.52, N AcOH)		
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-β-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -53.7^\circ$	0.15	0.45
($C_{43}H_{66}N_{14}O_{11}$, 955.10)	(c = 0.53, N AcOH)		
H-Gly-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH	$[\alpha]_D^{22} = -80.3^\circ$	0.25	0.32
($C_{41}H_{63}N_{13}O_{10}$, 898.09)	(c = 0.56, N AcOH)		

134296

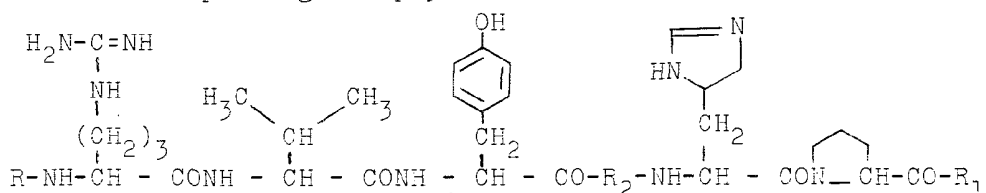
Tabell III (forts.)

Peptid (formel, molekylvekt)	Spesifikk vridning (Konsentrasjon; oppløsningsmiddel)	TLC på Merck silisiumdioksydgel-F-254- plater (detektering med Pauly's reagens) butanol/eddiksyre/ vann (6:2:3 v/v)	butanol/eddiksyre/ vann/pyridin (9:2:6:7 v/v)
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Leu-OH ($C_{46}H_{73}N_{13}O_{10}$, 968.22)	$[\alpha]_D^{17} = -56.7^\circ$ (c = 0.30, N AcOH)	0.15	0.45
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Leu-OH ($C_{47}H_{74}N_{14}O_{11}$, 1011.25)	$[\alpha]_D^{21} = -77.5^\circ$ (c = 0.54, N AcOH)	0.25	0.35
H-Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala-OH ($C_{43}H_{67}N_{13}O_{10}$, 926.14)	$[\alpha]_D^{21} = -80.5^\circ$ (c = 0.54, N AcOH)	0.28	0.35
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala-OH ($C_{44}H_{68}N_{14}O_{11}$, 969.17)	$[\alpha]_D^{22} = -63.7^\circ$ (c = 0.52, N AcOH)	0.10	0.38
H-Asn-Arg-val-Tyr-Val-His-Pro-Ala-OH ($C_{43}H_{66}N_{14}O_{11}$, 955.14)	$[\alpha]_D^{19} = -48.4^\circ$ (c = 0.25, N AcOH)	0.05	0.30
H-Asn-Arg-Val-Tyr-Ala-His-Pro-Ala-OH ($C_{41}H_{62}N_{14}O_{11}$, 927.03)	$[\alpha]_D^{22} = -68.2^\circ$ (c = 0.50, N AcOH)	0.10	0.35

I de ovenstående tabeller har man i overensstemmelse med UIPAC-nomenklaturen for å skille L- og D-formene av aminosyrer i polypeptider, markert L-aminosyrer med en stor forbokstav mens D-aminosyrer er markert med en liten forbokstav.

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte til fremstilling av nye, terapeutisk virksomme hepta- og oktapeptider med formelen:



hvor R betyr hydrogen, succinyl, L-aspartyl, sarkosyl, L-seryl, succinamyl, L-prolyl, glycyl eller D- eller L-asparaginyll, R_1 betyr en L-alanin-, L- eller D-leucin-, glycin-, L-isoleucin- eller β -alaninrest og R_2 betyr L-valyl, L-isoleucyl eller L-alanyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at man ved anvendelse av innen peptidkjemien vanlige metoder trinnvis sammenkobler syrene HR_1 , prolin, histidin, R_2 -OH, tyrosin, valin, argininin og i de tilfeller R ikke er hydrogen, også syren ROH, hvor R_1 , R_2 og R har de ovenfor angitte betydninger, til dannelselse av amidbindinger mellom syrene, idet amino- og karboksylgrupper som man ikke ønsker skal delta i reaksjonen, på i og for seg kjent måte maskeres temporært med en beskyttelsesgruppe, eller på annen kjent måte hindres i å delta i reaksjonen.