

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 150204 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0239/81

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/06

(22) Indleveringsdag: 20 jan 1981

(41) Alm. tilgængelig: 08 apr 1982

(44) Fremlagt: 05 jan 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 07 okt 1980 HU GO 1449

(71) Ansøger: *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT.: Budapest, HU.

(72) Opfinder: Sandor *Bajusz: HU, Erzsebet *Szell: HU, Eva *Barabas: HU, Daniel *Bagdy: HU, Zsuzsanna

*Mohai: HU.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af dipeptidyl-agmatiner eller deres hydrochlorider

(57) Sammenhang:

fjernelse af aminobeskyttelsesgruppen og eventuelt Y-blokeringen i guanidinogruppen og til sidst isolering af det fri dipeptidyl-agmatin i form af et salt.

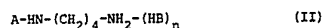
Forbindelser med formelen (I) er værdifulde anti-koagulanter, specielt når de anvendes sammen med heparin.

239-81

Agmatinderivater med formelen



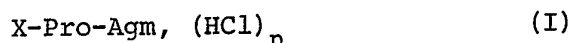
eller salte deraf, hvor X er en D- α -aminosyre med en sidekæde bestående af phenyl, phenylalkyl eller phenyl-(heteroatomholdigt alkyl, Pro er L-prolyl, Agm er agmatin, B er en syrerest, og n er 0, 1 eller 2, fremstilles ved kondensering af et 1,4-diaminobutanderivat med formelen



hvor A er $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})$, $\text{Y}-\text{HN}-\text{C}(\text{NH})$ eller Q, og Y og Q er aminobeskyttelsesgrupper, med en aminoblokeret L-prolin og trinvis med den efterfølgende aminosyre eller med et L-prolinpeptid, eventuelt efterfulgt af fraspaltning af Q, omdannelse af den frie aminogruppe til guanidino, derpå

DK 150204 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogi-
fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte dipep-
tidyl-agmatiner eller deres hydrochlorider med den al-
mene formel I,



hvor

X betyder en α -aminosyrerest af D-konfiguration med en
sidekæde valgt blandt phenyl, phenyl-(C₁₋₂-alkyl) el-
ler phenyl-(heteroatomholdigt C₂-alkyl),

Pro betyder en L-prolinrest, ifølge litteraturen (dvs.
Biochem. J. 126, 773 (1972)),

Agm står for en agmatingruppe, og

n betyder 0, 1 eller 2.

Det er kendt, at de simple acylderivater af agma-
tin (1-amino-4-guanidino-butan), som f.eks. tosyl-agmatin
(1-(p-toluen-sulfonylamido)-4-guanidino-butan) har evnen
til at undertrykke de proteolytiske reaktioner af både
trypsin og thrombin (Lorand og Rule: Nature, 190, 722
(1961); Rule og Lorand: Biochim. Biophys. Acta, 81, 130
(1964)).

Ifølge de ovennævnte forfattere forsinkes tosyl-
-agmatin størkningen af blodplasma og formodes også at un-
dertrykke fibrinogenthrombin-reaktionen. I egne eksperimen-
ter er fibrinogenthrombin-reaktionen imidlertid påvirket
af tosyl-agmatin i en ubetydelig grad: der kræves 0,7 mg
tosyl-agmatin for at fordoble (fra 15 til 30 sekunder)
thrombin-tiden af 1 ml af en opløsning indeholdende 1,25
mg fibrinogen og 1,25 NIH-enheder thrombin (standardenhe-
der ifølge National Institute of Health, Bethesda, Mary-
land, USA, jfr. Method of Enzymology, bind XLV, Proteoly-
tic Enzymes, del B, Academic Press, New York - San Franci-
sco - London (1976), især side 156, "Minimum Requirements
of Dried Thrombin").

Det er formålet med den foreliggende opfindelse at
fremstille hidtil ukendte agmatinderivater, der udviser
forøget antikoagulantaktivitet.

0

Det har vist sig, at hidtil ukendte dipeptidyl-
-agmatinderivater med den almene formel I, hvori X, Pro,
Agm og n er som defineret ovenfor, udviser signifikant
antikoagulantstyrke. Det er især gunstigt, hvis sidekæden
5 på den N-endestillede D- α -aminosyre del af dipeptidyl-agmati-
net er en phenyl-(C₁₋₂-alkyl)-gruppe. Således har D-phenyl-
alanyl-L-prolin-agmatin en særdeles høj aktivitet.

Tabel I viser virkningen af de hidtil ukendte
agmatinderivater med den almene formel I fremstillet ifølge
10 opfindelsen og af det kendte tosyl-agmatin på fibrinogen-
thrombin-reaktionen. Stoffernes styrke er defineret ved
den mængde af forbindelsen, der kræves for at fordoble
fibrinogens thrombintid. Endvidere er også angivet den re-
lative styrke af de hidtil ukendte agmatinderivater i
15 sammenligning med tosyl-agmatin (aktiviteten af den sidst-
nævnte droge er sat til 1).

Styrken af forbindelserne er afprøvet i det føl-
gende system:

0,2 ml af 0,5%'s oksefibrinogen i 0,9%'s NaCl-opløsning,
20 0,1 ml af en tris-(hydroxymethyl)-methylamin-hydrochlorid-
-pufferopløsning (pH-værdi = 7,4) indeholdende agmatinderi-
vatet, og
0,1 ml US Standard Human Thrombin 5 NIH enheder/ml.

Thrombintiden for systemet, som er frit for
25 agmatinderivat, er 15 sekunder.

0

Tabel I

Mængde af agmatinderivat, der kræves for at fordoble fibrinogens thrombintid.

5

Derivat ^{x)}	,ug/reaktionsblanding	Relativ aktivitet
H-D-Phg-Pro-Agm	1,4	200
10 H-D-Ser(Bzl)-Pro-Agm	0,7	400
H-D-Phe-Pro-Agm	0,12	2333
Tosyl-agmatin	280	1

15

x) De forkortelser, der anvendes for aminosyrerester og peptidderivater i tabellen og i det følgende er i overensstemmelse med litteraturen (Biochem. J., 126, 773 (1972)), endvidere betyder Phg phenylglycin, Agm betyder agmatin, og Bzl, Z og Boc står for benzyl-, benzyloxycarbonyl- og tert.-butyloxycarbonylgrupper. -D-Ser(Bzl)-gruppen betyder en O-benzyl-D-serin-rest.

20

Det har yderligere vist sig, at den antikoagulerende virkning af de hidtil ukendte dipeptidyl-agmatinderivater med den almene formel I forøges ved hjælp af gængs heparin, der anvendes til terapeutiske formål, hvilket kan bekræftes ved både in vitro og in vivo eksperimenter.

25

Ved in vitro-forsøg iagttages virkningen af D-Phe-Pro-Agm-2 HCl (i den almene formel I står X for en D-phenylalanindel, og n = 2) og heparin i et isoleret system i en fibrinogen-thrombin-reaktionsblanding (A) og i citratplasma fra mennesker (B):

30

A: 0,2 ml 0,5%'s oksefibrinogen i 0,9%'s saltopløsning,
0,1 ml af en tris-(hydroxymethyl)-methylamin-hydrochlorid-pufferopløsning (pH-værdi = 7,4) indeholdende agma-

35

0

tinderivatet og/eller heparin (132,2 E/mg U.S. Pharmacopoeia (U.S.P.) XVII), og

0,1 ml US Standard Human Thrombin 10 NIH enheder/ml.

5

Thrombintiden for systemet, som er frit for inhibitor, er 15 sekunder.

B: 0,2 ml citratplasma fra mennesker

0,1 ml af en tris-(hydroxymethyl)-methylamin-hydrochlorid-pufferopløsning (pH-værdi = 7,4) indeholdende agmatinderivatet og/eller heparin (132,2 E/mg U.S.P. XVII), og

10

0,1 ml US Standard Human Thrombin 10 NIH enheder/ml.

Thrombintiden for systemet, som er frit for inhibitor, er 15 sekunder.

15

Resultaterne er opsummeret i tabel II, som viser, hvordan thrombintiden forlænges ved hver drøge alene og ved en kombination af dem henholdsvis i system A og B, og som viser thrombintiden, beregnet på basis af de individuelle styrker (thrombintiden uden inhibitor er 1).

20

Den daglige dosis af forbindelserne med den almene formel I andrager for voksne 50 til 100 mg/time, når den indgives i intravenøse infusioner i 6 til 12 timer/dag.

25

Den daglige dosis af forbindelserne med den almene formel I i kombination med heparin andrager for voksne 50-60 mg peptid sammen med 3500-4500 E heparin, når den indgives 3 eller 4 gange om dagen.

35 30 25 20 15 10 5 0

Tabel II

Den antikoagulerende virkning af D-Phe-Pro-Agm-2 HCl forøget af heparin i et isoleret system (A)
og i citratplasma fra mennesker (B)

		Relativ thrombintid				
A	D-Phe-Pro-Agm ^{x)} μg/ml reaktionsblanding	Heparin	D-Phe-Pro-Agm ^{x)} alene	Heparin	D-Phe-Pro-Agm + Heparin beregnet	ved prøve
	0,10	0,05	2,5	1,1	2,6	4,0
	0,10	0,10	2,5	1,5	3,0	6,0
	0,10	0,20	2,5	2,0	3,5	9,0
	0,20	0,05	4,0	1,1	4,1	7,5
	0,20	0,10	4,0	1,5	4,5	13,0
	0,20	0,20	4,0	2,0	5,0	22,0
5						
B	0,05	0,05	2,2	1,0	2,2	4,0
	0,05	0,10	2,2	2,0	3,2	6,2
	0,05	0,20	2,2	3,8	5,0	9,5
	0,10	0,05	3,4	1,0	3,4	7,8
	0,10	0,10	3,4	2,0	4,4	13,0

x) D-Phe-Pro-Agm-2 HCl

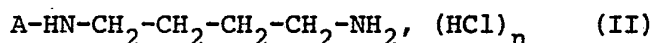
0

Ved in vivo-forsøg indgives subcutant til grå kaniner (2 til 3 kg):

- a. 5 mg/kg heparin (132,2 E/mg U.S.P. XVII),
- b. 10 mg/kg D-Phe-Pro-Agm-2 HCl, eller
- 5 c. 5 mg/kg heparin og 10 mg/kg D-Phe-Pro-Agm-2 HCl.

Efter indgivelse af drogerne udtages blodprøver fra kaninernes ørevener hvert 30. minut, og thrombintiden for helblodet bestemmes i en thromboelastograf (Hartert, H.: Zschr. f. clin. Med. 153, 423 (1955)). Under eksperimenterne blev det tydeligt, at både heparin og agmatinderivatet alene kun udviser lille aktivitet ved de indgivne doser (a og b); thrombintiden for helblodet forlænges med kun 1,5 gange (relativ thrombintid er i bedste fald 1,2 til 1,5), blodets prothrombin-aktivitet er i praksis også uændret. Hvis agmatinderivatet indgives sammen med heparin i samme doser (c), registreres der en forøget antikoagulerende virkning i forsøgsdyrene, den relative thrombintid 4- til 5-dobles i 3 til 4 timer i selvkontrol eksperimenterne. På samme tid formindskes prothrombin-aktiviteten i de blodprøver, der tages med forskellige intervaller, og som er afprøvet ifølge Quick (Quick, A.J.: J. Biol. Chem. 109, 73 (1935)) fra 100%'s niveauet, forud for behandling, til 20-30%. Denne værdi skal ifølge litteraturen betragtes som en antikoagulerende virkning af terapeutisk værdi.

25 Baseret på ovennævnte angår den foreliggende opfindelse en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte dipeptidyl-agmatinderivater med den almene formel I, hvori X, Pro, Agm og n er som defineret ovenfor, hvilken fremgangsmåde er karakteriseret ved, at et 1,4-diamino-butanderivat med den almene formel II



35 hvori A betyder $\text{H}_2\text{N-C(NH)}$, Y-HN-C(NH) eller Q, Y og Q står for amino-beskyttende grupper, der er almindeligt anvendt i peptidkemien, og n betyder 0, 1 eller 2, kondenseres

0

enten først med L-prolin, som er blokeret på sin amino-
gruppe, og derefter med en N-beskyttet aminosyre X-OH eller
med et N-beskyttet dipeptid X-L-Pro-OH ved hjælp af metoder,
som er kendte i peptid-kemien; O-beskyttelsesgruppen spal-
tes om nødvendigt fra 1,4-diamino-butandelen i den frem-
stillede forbindelse, og den derved frigjorte aminogruppe
omdannes til en guanidinogruppe ved hjælp af kendte meto-
der, hvorefter der fra det resulterende dipeptidyl-agmatin
fjernes både den N-terminale aminobeskyttelsesgruppe og en
eventuel Y-blokeringsgruppe i guanidinodelen, og det fri
dipeptidyl-agmatin eller et hydrochlorid deraf isoleres.

Forbindelser med den almene formel I, hvor X står
for en D-phenylalaninrest, fremstilles fortrinsvis ved dan-
nelse af et blandet anhydrid ud fra Z-D-Phe-Pro-OH (Niko-
laides et al.: J. Med. Chem. 11, 74 (1968)) og chlormyre-
syre-alkylester, og dette bringes til at reagere med agma-
tin-hydrochlorid (i formel II betyder A $H_2N-C(NH)$, og $n =$
1), eller med et agmatin med en benzyloxycarbonylgruppe
(Z) på sin guanidinogruppe (i formel II betyder A $Y-HN-C(NH)$,
Y betyder en Z-gruppe, og $n = 0$), Z-beskyttelsesgruppen el-
ler -grupperne spaltes fra det dannede dipeptidyl-agmatin,
og D-Phe-Pro-Agm isoleres i form af et dihydrochlorid.

De følgende eksempler er illustrative for opfindel-
sen.

25 R_f -værdierne bestemmes ved silicagel-tyndtlagschro-
matografi (Kieselgel G, REANAL, Budapest) i de følgende
opløsningsmiddelsystemer:

1. chloroform-methanol - 9:1
2. ethylacetat-pyridin-eddikesyre-vand - 240:20:6:11
- 30 3. ethylacetat-pyridin-eddikesyre-vand - 60:20:6:11
4. ethylacetat-pyridin-eddikesyre-vand - 30:20:6:11

Eksempel 1

D-Phenylalanyl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid (i formel I
35 står X for en D-phenylalaninrest, og $n = 2$)

0

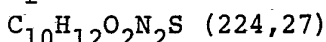
Trin 1

N-Benzylloxycarbonyl-S-methyl-isothiourinstof.

13,9 g (0,1 mol) S-methyl-isothiourinstof opløses i 50 ml vand, afkøles til en temperatur mellem 0 og 5°C, og ved denne temperatur og under konstant omrøring til-

5 sættes 15 ml (0,1 mol) chlormyresyre-benzylester og 50 ml 4 N natriumhydroxid i løbet af ca. 20 minutter. Det dannede bundfald filtreres fra, vaskes 3 gange med 50 ml koldt vand, derefter 3 gange med 50 ml n-hexan, og endelig

10 tørres det over phosphorpentoxid i vakuum. Udbytte: 15,7 g (70%) af den tilsigtede forbindelse. Smp.: 74-75°C; $R_f^{(1)} = 0,70-0,75$.



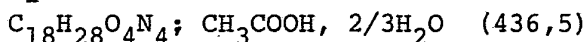
15 Beregnet: C: 53,55%, H: 5,39%, N: 12,49%, S: 14,3%
Fundet: C: 53,59%, H: 5,69%, N: 12,23%, S: 14,27%.

Trin 2N-Tert.-butyloxycarbonyl-N^G-benzyloxycarbonyl-agmatin

20 6,7 g (30 mmol) 1-(tert.-butyloxycarbonyl)-1,4-diaminobutan-hydrochlorid (Geiger: Liebigs Ann. Chem., 750, 165 (1971)) og 6,7 g (30 mmol) isothiourinstofderivat (eks. 1, trin 1) opløses i 15 ml ethanol, 4,2 ml (30 mmol) triethylamin tilsættes, og opløsningen holdes i 3 timer på et damp-

25 bad. Reaktionsblandingen indampes, reanensen opløses i en blanding af 150 ml benzen og 50 ml 1 N eddikesyre, benzenlaget vaskes med 10 ml vand og indampes ved formindsket tryk. Den krystallinske reanens suspenderes i 30-50 ml benzen nedkølet til ca. 10°C, filtreres og vaskes med 10

30 ml koldt benzen, derefter med n-hexan. Udbytte: 7,9 g (60%) af den tilsigtede forbindelse. Smp.: 99-101°C; $R_f^{(1)} = 0,60-0,64$.



35 Beregnet: C: 55,03%, H: 7,69%, N: 12,84%
Fundet: C: 55,1%, H: 7,8%, N: 12,65%.

0

Trin 3

N^G -Benzyloxycarbonyl-agmatin-dihydrochlorid (i formel II står A for $Y-HN-C(NH)$, Y for en benzyloxycarbonylgruppe, og $n = 2$).

5

5,5 g (15 mmol) beskyttet agmatin (eks. 1, trin 2) suspenderes i 10 ml ethylacetat, derefter tilsættes 20 ml ethylacetat indeholdende 11-15% saltsyre under omrøring og isafkøling. Omrøring fortsættes i 30 minutter, derefter fortyndes suspensionen med 10 ml ethylacetat, filtreres, vaskes med ethylacetat og tørres over kaliumhydroxid ved stuetemperatur og formindsket tryk. Udbytte: 4,3 g (83%) af den tilsigtede forbindelse. Smp.: $150-153^{\circ}C$; $R_f^{(4)} = 0,49-0,59$.

10

$C_{13}H_{20}O_2N_4 \cdot 2HCl, 1/3H_2O$ (343,3)

15

Beregnet: C: 45,48%, H: 6,65%, N: 16,32%. Cl: 20,65%

Fundet: C: 45,5%, H: 6,5%, N: 16,3%, Cl: 20,3%.

Trin 4

20

Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl- N^G -benzyloxycarbonyl-agmatin.

25

2 g (6 mmol) blokeret agmatin-hydrochlorid (eks. 1, trin 3) suspenderes i 10 ml dimethylformamid, 1,5 ml vand tilsættes, derefter indstilles opløsningens pH-værdi på 8-9 med triethylamin (ca. 1,5 ml). Opløsningen afkøles til $-15^{\circ}C$ og hældes i det på følgende måde fremstillede, blandede anhydrid: 2,4 g (6 mmol) benzyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolin (Nikolaides et al.: J. Med. Chem., 11, 74 (1968)) opløses i 12 ml dimethylformamid, afkølet til $-15^{\circ}C$, og ved denne temperatur og under omrøring tilsættes 0,66 ml (6 mmol) N-methyl-morpholin og 0,8 ml (6 mmol) chlormyresyre-isobutylester. Efter omrøring i 10 minutter hældes den ovennævnte dimethylformamidopløsning i. Om nødvendigt indstilles reaktionsblandingens pH-værdi på 8-9 med triethylamin, og omrøringen fortsættes i 1 time ved $-15^{\circ}C$ og i 1 time ved $0^{\circ}C$, derefter inddam-

35

0

pes reaktionsblandingen. Remanensen opløses i en blanding af 60 ml af en 4:1-benzen-ethylacetatopløsning og 20 ml vand, det organiske lag vaskes to gange med 20 ml vand indeholdende 1% morpholin, to gange med 20 ml 0,1 N
 5 saltsyre og endeligt to gange med 20 ml vand, tørres over natriumsulfat og indampes ved formindsket tryk. Udbytte: 3,1 g (80%) af titelforbindelsen. $R_f^{(2)} = 0,30-0,35$.

10 Trin 5

D-Phenylalanyl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid.

3,1 g (4,8 mmol) beskyttet dipeptidyl-agmatin (eks. 1, trin 4) opløses i 40 ml methanol, 4,8 ml 2 N saltsyre tilsættes, og blandingen hydrogeneres over pal-
 15 ladium-trækul. Når reaktionen er tilendebragt, frafiltreres katalysatoren, vaskes med vand, og filtratet indampes ved formindsket tryk. Remanensen opløses i 5 ml methanol og fortyndes med 30-40 ml acetone. De dannede krystaller frafiltreres, vaskes med acetone og lufttørres.
 20 Udbytte: 2,05 g (95%) af titelforbindelsen. Smp.: 216-219°C; $R_f^{(4)} = 0,5-0,6$;
 $[\alpha]_D^{20} = -125,5^\circ\text{C}$ ($c = 1$, 0,1 N eddikesyre).

25 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}_6$; 2HCl; $1/3\text{H}_2\text{O}$ (453,4)

Beregnet: C: 50,32%, H: 7,26%, N: 18,53%, Cl: 15,64%.

Fundet: C: 50,8%, H: 7,5%, N: 18,3%, Cl: 15,6%.

Eksempel 2

30 D-Phenylalanyl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid (i formel I står X for en D-phenylalaninrest, og $n = 2$).

Trin 1

Benzyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-agmatin-hydrochlorid.

35 4 g (10 mmol) benzyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolin (Nikolaides et al.: J. Med. Chem. 11, 74 (1968))

0 opløses i 20 ml dimethylformamid, afkøles til -15°C , og ved
denne temperatur og under konstant omrøring tilsættes 1,11 ml
(10 mmol) N-methyl-morpholin og 1,32 ml (10 mmol) chlormy-
resyre-isobutylester. Omrøring fortsættes i 10 minutter,
5 hvorefter den på følgende måde fremstillede opløsning hældes
deri: 2,05 g (10 mmol) agmatin-dihydrochlorid (i formel II
står A for en $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})$ -rest, og $n = 2$) suspenderes i 15 ml
dimethylformamid, 2 ml vand og derefter 1,4 ml (10 mmol)
triethylamin tilsættes, og der afkøles til -15°C . Reaktions-
10 blandingen omrøres i 2 timer ved -15°C , i 1 time uden afkø-
ling, derefter inddampes den ved formindsket tryk. Inddamp-
ningsremanensen opløses i 100 ml 0,2 N saltsyre og ekstrahe-
res 3 gange med 20 ml ethylacetat. Det vandige lags pH-værdi
indstilles på 8,0-8,5 med fast natriumhydrogencarbonat og
15 ekstraheres fem gange med 20 ml chloroform. De kombinerede
chloroformlag vaskes to gange med 10 ml vand og inddampes
ved formindsket tryk. Remanensen oparbejdes med diethyl-
ether, filtreres, vaskes med diethylether og lufttørres.
Udbytte: 4,1 g (75%) af den tilsigtede forbindelse.
20 $R_f^{(3)} = 0,5-0,6$.

Trin 2

D-Phenylalanyl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid.

3,8 g (7 mmol) blokeret dipeptidyl-agmatin (eks.
25 2, trin 1) opløses i 60 ml methanol, 3,5 ml 2 N saltsyre
tilsættes, og blandingen hydrogeneres over palladium-
-trækul. Når reaktionen er fuldstændig, frafiltreres ka-
talyzatoren, vaskes med vand, og filtratet inddampes ved
formindsket tryk. Remanensen opløses i 10 ml methanol og
30 fortyndes med 40-60 ml acetone. De dannede krystaller
fracfiltreres, vaskes med acetone og lufttørres. Udbytte:
2,95 g (95%) af det tilsigtede produkt. Smp.: $216-219^{\circ}\text{C}$;
 $R_f^{(4)} = 0,5-0,6$;
 $[\alpha]_D^{20} = -125,5^{\circ}\text{C}$. ($c = 1, 0,1$ N eddikesyre).

0

Eksempel 3

O-Benzyl-D-seryl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid (i formel I står X for en O-benzyl-D-serin-rest, og $n = 2$).

5

Trin 1

L-Prolyl-agmatin-dihydrochlorid.

3,7 g (10 mmol) benzyloxycarbonyl-L-prolyl-p-nitrophenylester (Goodman & Stueben: J. Am. Chem. Soc. 81, 3980 (1959)) opløses i en blanding af 10 ml dimethylformamid og 5 ml pyridin, 2,03 g (10 mmol) agmatin-dihydrochlorid (i formel II står A for en $H_2N-C(NH)$ -rest, og $n = 2$) og 1,4 ml (10 mmol) triethylamin tilsættes og omrøres i 16-20 timer. Reaktionsblandingen indampes ved formindsket tryk. Remanensen opløses i en blanding af 50 ml 0,1 N saltsyre og 20 ml ethylacetat, det vandige lag ekstraheres to gange med 20 ml diethylether, neutraliseres med fast natriumhydrogencarbonat og ekstraheres derefter fem gange med 20 ml chloroform. De kombinerede chloroformlag vaskes to gange med vand og indampes ved formindsket tryk. Inddampningsremanensen, benzyloxycarbonyl-L-prolyl-agmatin-hydrochlorid ($R_f^{(3)} = 0,32-0,42$), opløses i 40 ml methanol, 10 ml 1 N saltsyre tilsættes, og blandingen hydrogeneres i nærværelse af palladium-trækul. Når reaktionen er fuldstændig, frafiltreres katalysatoren, vaskes med vand, og filtratet indampes ved formindsket tryk. Inddampningsremanensen oparbejdes med diethylether, frafiltreres, vaskes med diethylether og tørres over kaliumhydroxid ved formindsket tryk. Udbytte: 2,1 g (70%) af den tilsigtede forbindelse. Smp.: 186-189°C; $R_f^{(4)} = 0,15-0,25$; $[\alpha]_D^{20} = -33,25^\circ C$ ($c = 1$, methanol).

$C_{10}H_{21}ON_5 \cdot 2HCl$ (300,2)

Beregnet: C: 40,00%, H: 7,72%, N: 23,32%, Cl: 23,62%

Fundet: C: 40,00%, H: 7,7%, N: 23,0%, Cl: 23,3%.

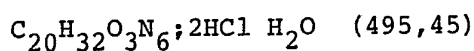
35

0

Trin 2

O-Benzyl-D-seryl-L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid.

1,5 g (5 mmol) L-prolyl-agmatin-dihydrochlorid
 (eks. 3, trin 1) suspenderes i 5 ml dimethylformamid,
 0,5 ml vand og 0,7 ml (5 mmol) triethylamin tilsættes,
 blandingen afkøles til -15°C og hældes i det på følgende
 måde fremstillede, blandede anhydrid: 1,5 g (5 mmol) tert.-
 butyloxycarbonyl-O-benzyl-D-serin (Otsuka et al.: Bull.
 Chem. Soc. Japan, 39, 1171 (1966)) opløses i 10 ml dime-
 thylformamid, afkøles til -15°C , og ved denne temperatur
 og under omrøring tilsættes 0,6 ml (5 mmol) N-methyl-mor-
 pholin og 0,7 ml (5 mmol) chlormyresyre-isobutylester. Om-
 røring fortsættes i 10 minutter, derefter hældes ovennæv-
 nte dimethylformamidopløsning deri. Reaktionsblandingen om-
 røres i 1 time ved -15°C , derefter i yderligere 1 time ved
 0°C og inddampes til sidst ved formindsket tryk. Remanensen
 opløses i en blanding af 10 ml vand og 50 ml chloroform,
 chloroformlaget vaskes to gange med 10 ml vand og to gange
 med 10 ml af en 5% 's natriumhydrogencarbonatopløsning, tør-
 res over natriumsulfat og inddampes ved formindsket tryk.
 Remanensen oparbejdes med diethylether, frafiltreres, vas-
 kes med diethylether og lufttørres. Det resulterende tert.-
 butyloxycarbonyl-O-benzyl-D-seryl-L-prolyl-agmatin-hydro-
 chlorid ($R_f^{(3)} = 0,4-0,5$) suspenderes i 5 ml ethylacetat,
 og ved konstant omrøring og isafkøling tilsættes 10 ml
 11-15% 's saltsyre indeholdende ethylacetat.
 Efter omrøring i 30 minutter filtreres suspensionen, vaskes
 med ethylacetat og tørres over kaliumhydroxid ved formind-
 sket tryk. Produktet opløses i 20 ml vand og frysetørres.
 Udbytte: 1,62 g (65%) af titelproduktet. Smp.: $110-115^{\circ}\text{C}$;
 $R_f^{(4)} = 0,56-0,66$; $[\alpha]_D^{20} = -47^{\circ}\text{C}$ ($c = 1, 0,1$ N eddikesyre).



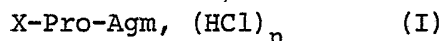
Beregnet: C: 48,48%, H: 7,32%, N: 16,96%, Cl: 14,31%
 Fundet: C: 48,4%, H: 7,4%, N: 16,85%, Cl: 14,3%.

0

P a t e n t k r a v .

Analogifremgangsmåde til fremstilling af dipeptidyl-agmatiner eller deres hydrochlorider med den almene formel I

5



hvor

X betyder en α -aminosyrerest af D-konfiguration med en sidekæde valgt blandt phenyl, phenyl-(C₁₋₂-alkyl) eller phenyl-(heteroatomholdigt C₂-alkyl),

10

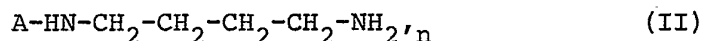
Pro betyder en L-prolinrest,

Agm står for en agmatingruppe, og

n betyder 0, 1 eller 2,

kendetegnet ved, at et 1,4-diamino-butanderivat med den almene formel II

15



hvor

A betyder H₂N-C(NH), Y-HN-C(NH) eller Q

Y og Q står for amino-beskyttende grupper, der er almindeligt anvendt i peptid-kemien, og

20

n betyder 0, 1 eller 2,

kondenseres enten først med L-prolin, som er blokeret på sin aminogruppe, og derefter med en N-beskyttet aminosyre X-OH eller med et N-beskyttet dipeptid X-L-Pro-OH ved hjælp af metoder, som er kendte i peptid-kemien, Q-beskyttelsesgruppen spaltes om nødvendigt fra 1,4-diamino-butandelen i den fremstillede forbindelse, og den derved frigjorte aminogruppe omdannes til en guanidinogruppe ved hjælp af kendte metoder, hvorefter der fra det resulterende dipeptidyl-agmatin fjernes både den N-terminale aminobeskyttelsesgruppe og en eventuel Y-blokeringsgruppe i guanidinodelen, og det fri dipeptidyl-agmatin eller et hydrochlorid deraf isoleres.

25

30

Fremdragne publikationer: