



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

197268
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52

(22) Přihlášeno 08 03 76

(21) [PV 1513-76]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 08 03 75
(10144/75) Velká Británie

(40) Zveřejněno 31 07 79

(45) Vydáno 15 02 83

(72)
Autor vynálezu

MORGAN BARRY ARNOLD, HULL a
SCHAFFER DEREK JOHN, HERTS (Velká Británie)

(73)
Majitel patentu

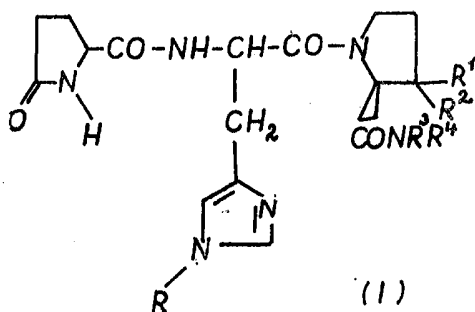
RECKITT AND COLMAN PRODUCTS LIMITED, LONDÝN
(Velká Británie)

(54) Způsob přípravy L-pyroglutamyl-L-histidyl-3-alkylprolin- amidových derivátů

1

Vynález se týká způsobu přípravy L-pyroglutamyl-L-histidyl-3-alkylprolinamidových derivátů a terapeutických směsí obsahujících tyto sloučeniny.

Výše uvedené připravené sloučeniny podle vynálezu mají následující obecný vzorec (I):



ve kterém znamená

R atom vodíku nebo methylovou skupinu,
R¹ je alkylová skupina obsahující celkově 1 až 3 atomy uhlíku,

R² je atom vodíku nebo methylová skupina,

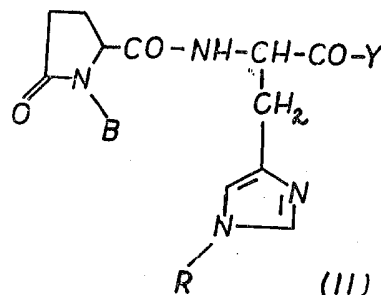
R³ představuje atom vodíku, alkylovou skupinu obsahující celkově 1 až 6 atomů uh-

2

líku nebo cykloalkylovou skupinu obsahující celkově 3 až 6 atomů uhlíku, a

R⁴ je atom vodíku nebo methylová skupina.

Podstata způsobu přípravy sloučenin obecného vzorce (I) podle uvedeného vynálezu, ve kterém mají substituenty R, R¹, R², R³ a R⁴ shora uvedený význam, spočívá v tom že se do adiční reakce uvede sloučenina obecného vzorce (II):

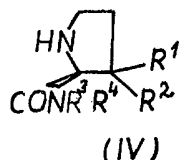


ve kterém znamená

B atom vodíku nebo benzyloxykarbonylovou skupinu,

R má shora uvedený význam, a

Y je hydroxyskupina nebo azidová skupina, se sloučeninou obecného vzorce (IV):



ve kterém mají

R^1 , R^2 , R^3 a R^4 již shora uvedený význam, přičemž v případě kdy je substituent B benzyloxykarbonylová skupina, následuje hydrogenace.

Ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu, ve kterém se připravují L-pyrogutamyl-L-histidyl-3-alkylprolinamidové deriváty obecného vzorce (I), ve kterém mají R , R^1 , R^2 shora uvedený význam, a R^3 je atom vodíku, a R^4 je atom vodíku, se do adiční reakce uvádí sloučenina obecného vzorce (II), ve kterém mají R a Y již výše uvedený význam, a B je atom vodíku, se sloučeninou obecného vzorce (IV), ve kterém mají R^1 a R^2 shora uvedený význam, a R^3 je atom vodíku a R^4 je atom vodíku.

V dalším výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu, ve kterém se připravují L-pyrogutamyl-L-histidyl-3-alkylprolinamidové deriváty obecného vzorce (I), ve kterém mají substituenty R , R^1 , R^2 , R^3 a R^4 shora uvedený význam, se postupuje tak, že v případě kdy je substituentem Y hydroxyskupina, se adiční reakce provádí v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu a hydroxybenzotriazolu.

Výše uvedené sloučeniny obecného vzorce (I) podle uvedeného vynálezu jsou odvozeny od aminokyselin, L-pyrogutamové kyseliny a od L-histidinu, přičemž u uvedených sloučenin obecného vzorce (I) jsou histidinový zbytek a pyrogutamový zbytek v L-konfiguraci.

Uvedený vynález se rovněž týká terapeutických směsí, které obsahují sloučeniny obecného vzorce (I), připravené postupem podle uvedeného vynálezu, současně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Sloučeniny obecného vzorce (I) podle uvedeného vynálezu projevují farmakologickou aktivitu u myši při metodě hypothermie, při screeningovém testu antidepresivního účinku, a je možno předpokládat, že je možno těchto sloučenin rovněž použít při léčení deprese. U těchto sloučenin podle uvedeného vynálezu, které po stránce chemické náleží k hormonu TRH, L-pyrogutamyl-L-histidyl-L-prolinamidu, který je uvolňován hypothalamickým thyrotropinem, je možno předpokládat, že budou projevovat podobný účinek na zadní lalok hypofýzy.

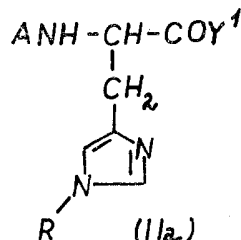
Při použití běžných metod dostatečně známých v chemii peptidických sloučenin je možno sloučeniny obecného vzorce (I) podle uvedeného vynálezu připravit adiční reakcí sloučeniny obecného vzorce (II), uvedené výše, ve kterém znamená

B atom vodíku benzyloxykarbonylovou skupinu,

R je atom vodíku nebo methylová skupina,

a

Y je hydroxyskupina nebo azidová se sloučeninou obecného vzorce (IV), ve kterém mají substituenty R^1 , R^2 , R^3 a R^4 již shora uvedený význam, a v případě kdy je substituentem B benzyloxykarbonylová skupina, následuje hydrogenace, přičemž při prvním alternativním provedení se do adiční reakce uvede sloučenina obecného vzorce (IIa):

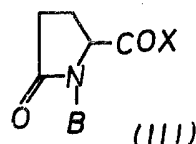


ve kterém má

R již shora uvedený význam,

A je atom vodíku a

Y^1 je chránicí skupina, jako například nižší alkoxyskupina, která obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, se sloučeninou obecného vzorce (III):



ve které znamená

X skupinu, která je schopná tvořit peptidické vazby, jako je například hydroxyskupina, substituovaná fenoxyskupina (jako je například p-nitrofenoxyskupina, tri- nebo pentachlorfenoxyskupina) nebo azidová skupina, a

B má již shora uvedený význam, za vzniku dipeptidické skupiny, ve které se potom skupina Y^1 převede na skupinu Y , která je schopná tvořit peptidické vazby, jako je například hydroxyskupina nebo azidová skupina, a potom se provede reakce se sloučeninou obecného vzorce (IV), ve které mají substituenty R^1 , R^2 , R^3 a R^4 již shora uvedený význam. V následující fázi proběhne odstranění všech chránicích skupin. Adiční reakce probíhá na karboxylové skupině, to znamená v případě sloučeniny obecného vzorce (IIa) kdy znamená substituent X hydroxyskupinu nebo u dipeptidické sloučeniny, ve které substituent Y znamená hydroxyskupinu, přičemž se tato reakce provádí v přítomnosti adičního činidla jako je například N,N'-dicyklohexylkarbodiimid, a ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu v přítomnosti racemizujícího inhibitoru, jako je například hydroxybenzotriazol.

Podle druhého alternativního provedení postupu podle uvedeného vynálezu je možno s použitím běžných postupů dostatečně známých v chemii peptidických sloučenin připravit sloučeniny podle uvedeného vynálezu.

zu adiční reakcí sloučeniny obecného vzorce (IIa), který je uveden výše, a ve kterém znamená

R substituent stejného významu jako je uvedeno výše,

A je chránicí skupina dusíku, běžně známá a používaná v chemii peptidických sloučenin (jako je například t-butoxykarbonyl nebo benzyloxykarbonyl), a

Y¹ je skupina, která je schopná tvořit peptidické vazby, jako je například hydroxyskupina, substituovaná fenoxyskupina nebo azidová skupina, se sloučeninou obecného vzorce (IV), ve kterém mají substituenty R¹, R², R³, R⁴ již shora uvedený význam, za vzniku dipeptidické sloučeniny. V dalším postupu se odstraní chránicí skupina na dusíku, a provede se adiční reakce získané sloučeniny, za pomoci běžných metod dostatečně známých v chemii peptidických sloučenin, se sloučeninou obecného vzorce (III), který je uveden výše, a ve kterém znamená

X skupinu, která je schopná tvořit peptidické vazby, jako je například hydroxyskupina, substituovaná fenoxyskupina, azidová skupina nebo chlor, a

B je vodík nebo chránicí skupina, jako je například benzyloxykarbonyl, přičemž potom následuje odstranění všech chránicích skupin. Adiční reakce, které probíhají na volných karboxylových skupinách, to znamená v případech, kdy jsou substituenty X nebo Y hydroxyskupiny, se provádějí v přítomnosti adičního činidla, jako je například N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu, a ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu se tyto reakce provádějí v přítomnosti racemizujícího inhibitoru, jako je například hydroxybenzotriazol.

Sloučeniny obecného vzorce (IV), ve kterém mají substituenty R¹, R², R³ a R⁴ shora uvedený význam, je možno připravit z odpovídajících prolinů, které jsou substituovány alkylovými skupinami, přičemž se chrání iminová funkční skupina pomocí například t-butoxykarbonylové skupiny nebo pomocí benzyloxykarbonylové skupiny, potom následuje aktivování karbonylové skupiny některou z běžných metod, které jsou dostatečně známy v chemii peptidických sloučenin (jako je například metoda se smíšeným anhydridem nebo metoda s aktivovaným esterem), v dalším postupu se provede adiční reakce takto získané aktivované sloučeniny s amoniakem nebo s aminem v prostředí vhodného rozpouštědla a nakonec se provede odstranění chránicí skupiny na dusíku za pomoci běžných metod, dostatečně známých v chemii peptidických sloučenin.

Postup podle uvedeného vynálezu bude v dalším ilustrován praktickými příklady provedení, které rozsah vynálezu nijak neomezuje, přičemž v těchto příkladech je teplota uváděna ve stupních Celsiových.

Příklad 1

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolinamid

(obecný vzorec I, ve kterém znamená

R vodík,

R¹ je trans-3-methyl, a

R², R³ a R⁴ jsou vodíky)

I) N-t-Butoxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolin.

Podle tohoto provedení se přidá triethylamin (3,5 ml) a t-butyl-2,4,5-trichlorfenylkarbonát (3,5 g) k roztoku trans-3-methyl-L-prolinu (1,25 g) v t-butanolu (12 ml) a vody (8 ml). Takto připravená směs se zahřívá na teplotu 60 °C po dobu 2 hodin, potom se tento roztok odpaří a získaný zbytek se rozpustí v roztoku 1 N hydrogenuhlitanu sodného (50 ml) a potom se tento roztok promyje etherem. V dalším postupu se přidá přebytek pevné kyseliny citronové, získaný produkt se extrahuje ethylesterem kyseliny octové, spojené extrakty se suší síranem sodným a odpaří, čímž se získá surový krystalický produkt (1,6 g). Rekrystalizací ze směsi ethylesteru kyseliny octové a lehkého benzínu (která se provádí při teplotě pohybující se v rozmezí od 40 do 60 °C) se získá požadovaný produkt v množství 1,33 g. Teplota tání takto připraveného produktu se pohybuje v rozmezí od 146 do 150 °C,

$[\alpha]_D^{20} -60,1^\circ\text{C}$,

(c, 1,0, chloroform).

II) N-t-Butoxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolinamid.

Podle tohoto provedení se přidá N-methylmorfolin (6,0 ml) k roztoku N-t-butoxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolinu (1,1 g) v tetrahydrofuranu (50 ml) při teplotě -20 °C. K tomuto roztoku se potom přidá čerstvě oddestilovaný izobutylchlorformiát (0,8 g), přičemž toto přidávání se provádí po kapkách, a takto připravený roztok se míchá 10 minut při teplotě -20 °C. K takto zpracovanému roztoku se potom přidá koncentrovaný roztok amoniaku (5 ml) a získaný roztok se potom míchá po dobu 2 hodin, dále se odpaří, čímž se získá zbytek, který se vnese do ethylesteru kyseliny octové (100 ml) a takto připravený roztok se promyje 10% vodným roztokem hydrogenuhlitanu sodného, potom solným roztokem a nakonec se suší síranem sodným. Odpařením se získá surový krystalický produkt (1,0 g). Požadovaný výsledný produkt se získá rekrystalizací ze směsi ethylesteru kyseliny octové a lehkého benzínu, přičemž tato rekrystalizace se provede při teplotě pohybující se v rozmezí od 40 do 60 °C.

Výtěžek 0,91 g, teplota tání 100 až 101 °C,
 $[\alpha]_D^{20} - 79,7^\circ$,
 (c, 1,0, chloroform).

III) Hydrochlorid trans-3-methyl-L-prolinamidu.

Podle tohoto provedení se přidá roztok chlorovodíku v dioxanu (o koncentraci 7,5 N, 5 ml) k roztoku N-t-butoxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolinamidu (0,65 g) v 10 ml dioxanu. Po 2 hodinách se krystalická pevná hmota zfiltruje a potom se provede rekrytalizace ze směsi ethanolu a etheru, přičemž se získá výsledný požadovaný produkt.

Výtěžek 0,47 g,
 teplota tání 235 až 237 °C,
 $[\alpha]_D^{20} - 14,8^\circ$,
 (c, 1,0, voda).

IV) L-Pyroglyutamyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolinamid

Podle tohoto provedení se hydrochlorid trans-3-methyl-L-prolinamidu (5 ml), přidá k roztoku L-pyroglyutamyl-L-histidinazidu, který se připraví z hydrazidu (0,9 g), v dimethylformamidu (15 ml), při teplotě -20 stupňů Celsia, a potom se k tomuto roztoku přidá triethylamin (0,45 ml). Takto připravená směs se potom ponechá stát při teplotě cokoliv po dobu 12 hodin, zfiltruje se, odpaří se, přičemž se získá zbytek, který se v dalším postupu rozpustí v 1% roztoku pyridinu ve vodě (10 ml), a potom se tento roztok vede do kolony naplněné sulfoethylovou pryskyřicí Sephadex [což je kationtovýměnná pryskyřice obsahující zesítný dextran-polysacharidový polymer se sulfoethylovými funkčními skupinami], označení C-25 v množství 50 g pryskyřice ve vlhké formě. Průměr kolony byl 2 cm. Pryskyřice se nasytí do rovnovážného stavu 1% vodným roztokem pyridinu.

Tato kolona se potom v dalším postupu eluuje gradientovou metodou za pomoci 5% vodného roztoku pyridinu, postupující přes 1 litrovou kulovitou mísici nádobu, naplněnou 1% vodným roztokem pyridinu. Jednotlivé frakce, které obsahují produkt (tyto frakce se zjistí na základě optické otáčivosti a chromatografie prováděné v tenké vrstvě), se spojí, potom se provede odpaření a získaný zbytek se trituruje etherem, čímž se získá produkt (jako monohydrát) ve formě amorfni pevné hmoty.

Výtěžek 0,70 g,
 $[\alpha]_D^{20} - 46,7^\circ$,
 (c, 1,0, voda),
 R_F 3B: 0,48,
 teplota tání 145 až 148 °C,

Analýza: pro $C_{17}H_{24}N_6O_4$, H_2O

nalezeno:

52,5 % C, 7,0 % H, 21,3 % N,

vypočteno:

51,8 % C, 6,7 % H, 21,3 % N.

Příklad 2

L-Pyroglyutamyl-L-histidyl-trans-3-ethyl-dl-prolinamid.

I) Trans-3-ethyl-dl-prolin.

Podle tohoto provedení se diethylbenzyl-oxykarbonylaminomalónát (11,5 g, 38 mM) rozpustí v suchém ethanolu (50 ml) a tato směs se potom přidá k roztoku sodíku (150 miligramů) v suchém ethanolu (10 ml). Potom se přidá k této směsi pent-2-enal (3,2 g, 38 mM) v ethanolu (10 ml), přičemž tento přídatek se uskuteční za míchání po kapkách, a potom se roztok míchá po dobu další 1 hodiny. K takto připravenému roztoku se potom přidá roztok kyseliny octové (0,29 mililitrů) v ethanolu (1 ml), a tento roztok se potom podrobí hydrogenaci, která se provádí po dobu 2 hodin při atmosférickém tlaku a použije se při ní jako katalyzátoru paládía na uhlí v koncentraci 5 %. V dalším postupu se odstraní katalyzátor filtrací a filtrát se odpaří. Tímto postupem se získá zbytek, který se rozpustí v chloroformu a získaný roztok se potom promyje solankou, která obsahuje malé množství hydrogenuhlíčitanu sodného, potom se tento roztok suší síranem sodným a nakonec se odpaří. Tímto postupem se získá zbytek, který se oddestiluje při tlaku 1,95 kPa, přičemž se získá 4-ethyl-5,5-dikarboethoxy-2-pyrrolin, ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek 5,65 g,
 teplota tání 115 až 120 °C (při 1,95 kPa),
 I.R. spektrum:
 1715, 1610 cm^{-1} .

Takto získaný pyrrolin (4,68 g, 19,5 mM) se přidá ke směsi 1 M hydroxidu sodného (80 ml) a ethanolu (80 ml), a získaný roztok se míchá při teplotě 50 °C po dobu 4 hodin. Takto zpracovaný roztok se potom ochladí, přidá se k němu borohydrid sodný (1,0 g), a nakonec se tento roztok míchá při teplotě 25 °C po dobu dalších 10 hodin. Takto získaný roztok se potom opatrně okyslí za pomoci zředěného roztoku kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH 4, potom se tento roztok zkoncentruje a vnese do kolony, naplněné pryskyřicí Dowex 50Wx8 [což je kationtovýměnná pryskyřice obsahující zesítný dextranový polysacharidový polymer s diethylaminoethylovými funkčními skupinami, v H^+ formě, množství 100 mililitrů]. Eluováním pomocí vodného roztoku amoniaku o koncentraci 2 M, se získá roztok, který po odpaření poskytne trans-3-ethyl-dl-prolin.

Výtěžek 2,1 gramu,
teplota tání 208 až 209 °C,
R_F 38: 0,43.

Analýza na aminokyselinovém analyzátoru Jeol 6AH (kolona 50 cm, pufr 0,2 N citronanu sodného, hodnota pH 3,25, teplota 57 °C), ukázala jeden pík (eluční doba 117 minut).

(II) t-Butyloxykarbonyl-trans-3-ethyl-dl-prolin.

Tato sloučenina se připraví z trans-3-ethyl-dl-prolinu (1,72 g), přičemž se použije stejného postupu jako v příkladu 1 (I), a získá se ve formě oleje.

Výtěžek 2,82 g,
R_F 3A: 0,92.

(III) t-Butyloxykarbonyl-trans-3-ethyl-dl-prolinamid.

Tato sloučenina se připraví z t-butyloxykarbonyl-trans-3-ethyl-dl-prolinu (3,5 g), způsobem, který je popsán v příkladu 1 (II) přičemž se získá po chromatografování na koloně naplněné silikagelem, t-butyloxykarbonyl-trans-3-ethyl-dl-prolinamid ve formě bílých krystalků.

Výtěžek: 3,1 g,
teplota tání 78 až 80 °C.

(IV) trans-3-Ethyl-dl-prolinamid-hydrochlorid.

Tato sloučenina se připraví z t-butyloxykarbonyl-trans-3-ethyl-dl-prolinamidu (3,0 gramů) stejným postupem, který je uveden v příkladu 1 (III), přičemž se získá trans-2-ethyl-dl-prolinamidhydrochlorid ve formě bílých krystalků.

Výtěžek 1,5 g,
teplota tání 206 až 207 °C,
R_F 3A: 0,22,
R_F 3B: 0,72.

V) trans-3-Ethyl-dl-prolinamid.

Podle tohoto provedení se hydrochlorid trans-3-ethyl-dl-prolinamidu v množství 0,5 gramu, rozpustí ve vodě a tento roztok se potom vede kolonou naplněnou pryskyřicí DEAE-Sephadex v OH⁻ formě (což je aniontovýměnná pryskyřice obsahující zesítěný dextranový polysacharidový polymer s diethylaminoethylovými funkčními skupinami. V dalším postupu se oddělí frakce, která obsahuje produkt (tyto frakce se zjistí chromatografií prováděnou v tenké vrstvě), tyto frakce se spojí a odpaří do sucha, přičemž se získá hydrát trans-3-ethyl-dl-prolinamidu, ve formě bílé pevné hmoty.

Výtěžek 0,45 g,
teplota tání 89,5 až 91 °C,
R_F 3A: 0,22,
R_F 3B: 0,72.

VI) L-Pyroglutamyl-L-histidyltrans-3-ethyl-dl-prolinamid.

Podle tohoto provedení se postupuje tak, že se trans-3-ethyl-dl-prolinamid (288 mg, 2 mM), benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidin (822 mg, 2 mM) a hydroxybenzotriazol (550 mg, 4 mM) rozpustí v dimethylformamidu (6 ml), získaný roztok se ochladí na teplotu 0 °C, přičemž v dalším postupu se k této směsi přidá dicyklohexylkarbodiimid (480 mg, 2,2 mM) a získaná směs se potom míchá 18 hodin. Takto zpracovaná směs se potom zfiltruje a filtrát se odpaří. Získá se olejovitá hmota, která se rozpustí ve směsi tetrahydrofuranu a vody (v poměru 1:1, v množství 80 ml), dále se přidá paládium nanosené na uhlí (v koncentraci 10 %, a v množství 60 mg) a takto připravený roztok se potom podrobí hydrogenování po dobu 4 hod. při atmosférickém tlaku. Použitý katalyzátor se potom odstraní odfiltráním a získaný filtrát se odpaří do sucha. Získaná gumovitá hmota se potom rozdělí mezi ethylester kyseliny octové v množství 50 ml, a vodu v množství 80 ml. Získaná vodná fáze se oddělí, odpaří se do sucha a takto získaný zbytek se rozpustí ve vodném roztoku který obsahuje 1 % kyseliny octové a 0,05 % pyridinu. Tento roztok se potom vede do kolony naplněné pryskyřicí S.P.-Sephadex C 25 v pyridinové formě (což je kationtovýměnná pryskyřice obsahující zesítěný dextranový polysacharidový polymer se sulfopropylými funkčními skupinami), která se nejdříve nasytí do rovnovážného stavu pomocí vodného roztoku, obsahujícího 1 % kyseliny octové a 0,05 % pyridinu. Tato kolona se potom eluuje gradientovou metodou, přičemž se použije vodného roztoku, který obsahuje 1 % kyseliny octové a 1 procento pyridinu, který postupuje přes kulovitou mísicí nádobu, naplněnou vodným roztokem, který obsahuje 1 procento kyseliny octové a 0,05 % pyridinu. V dalším postupu se oddělí frakce obsahující produkt (tyto frakce se zjistí chromatografií, prováděnou v tenké vrstvě), tyto frakce se spojí a nakonec se provede odpaření, přičemž se získá L-pyroglutamyl-L-histidyl-trans-3-ethyl-dl-prolinamid ve formě bílé amorfni pevné hmoty.

Výtěžek 205 g,
teplota tání 156 až 160 °C,
R_F 3A: 0,27,
R_F 3B: 0,50.

Na aminokyselinovém analyzátoru byly po kyselé hydrolýze zjištěny následující poměry:

histidin: 0,95,
glutamová kyselina: 0,99,
3-ethylprolin: 1,06.

Příklad 3

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-3,3-dimethyl-dl-prolinamid.

(I) 3,3-dimethyl-dl-prolin.

Podle tohoto provedení se diethylbenzyl-oxokarbonylaminomalonát (3,09 g, 10 mM) rozpustí v suchém ethanolu (15 ml) a potom se tato směs přidá k roztoku ethoxidu sodného (připravenému ze 100 ml sodíku) v ethanolu (6 ml) a takto připravený roztok se potom míchá při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. K tomuto roztoku se potom v dalším postupu přidá kyselina octová (0,28 ml) a roztok se podrobí hydrogenování, které se provede po dobu 24 hodin, přičemž se jako katalyzátoru použije paládium naneseného na uhlí (v koncentraci 10 %, a množství 500 mg). Takto zpracovaný roztok se potom zfiltruje, odpaří se, přičemž se získá zbytek, který se porobí chromatografickému dělení na koloně naplněné silikagelem, přičemž se jako elučního činidla použije směsi etheru a petroletheru (v poměru 1:1), a proces se provede při teplotě pohybující se v rozmezí od 40 do 60 °C, přičemž výsledkem je 2,2-dikarboethoxy-3,3-dimethylpyrrolidin v množství 0,9 g.

Takto připravený diester se potom zahřívá pod zpětným chladičem (850 mg) v 5 M roztoku kyseliny chlorovodíkové (10 mililitrů) po dobu 4 hodin, přičemž po odpaření se získá práškovitá bílá pevná hmota. Rekrystalizací ze směsi methanolu a etheru se získá hydrochlorid 3,3-dimethyl-dl-prolinu ve formě bílých krystalků.

Výtěžek 451 mg,
teplota tání 110 až 112 °C.

II) t-Butyloxykarbonyl-3,3-dimethyl-dl-prolin.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z hydrochloridu 3,3-dimethyl-dl-prolinu (1,07 g) postupem stejným, jako je uveden v příkladu 1 (I), přičemž výsledkem je t-butyloxykarbonyl-3,3-dimethyl-dl-prolin ve formě bílé krystalické pevné hmoty.

Výtěžek 1,45 g,
teplota tání 107 až 108,5 °C.

III) t-Butyloxykarbonyl-3,3-dimethyl-dl-prolinamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z t-butyloxykarbonyl-3,3-dimethyl-dl-prolinu (v množství 900 mg) stejným postupem jako je uveden v příkladu 1 (II), přičemž se získá t-butyloxykar-

bonyl-3,3-dimethyl-dl-prolinamid ve formě bílé krystalické pevné hmoty.

Výtěžek 375 mg,
teplota tání 115 až 117 °C.

IV) Hydrochlorid 3,3-dimethyl-dl-prolinamidu.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina získá z t-butyloxykarbonyl-3,3-dimethyl-dl-prolinamidu (v množství 300 miligramů) stejným způsobem jako je to uvedeno v příkladu 1 (III), přičemž výsledkem je hydrochlorid 3,3-dimethyl-dl-prolinamidu ve formě bílé krystalické pevné hmoty.

Výtěžek 175 mg,
teplota tání 220 až 223 °C.

V) 3,3-Dimethyl-dl-prolinamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z 3,3-dimethyl-dl-prolinu (v množství 17 mg) stejným postupem jako je uveden v příkladu 2 (V), přičemž výsledná sloučenina se získá ve formě bílé pevné hmoty.

Výtěžek 135 mg,
R_F 3A: 0,19,
R_F 3B: 0,70.

VI) L-pyroglutamyl-L-histidyl-3,3-dimethyl-dl-prolinamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z 3,3-dimethyl-dl-prolinamidu (v množství 100 mg) stejným způsobem jako je uveden v příkladu 2 (VI), přičemž výsledný produkt se získá ve formě bílého prášku.

Výtěžek 195 mg,
teplota tání 180 °C,
teplota měknutí 135 °C,
R_F 3B: 0,65.

Na aminokyselinovém analyzáru byly po kyselé hydrolýze získány následující poměry:

histidin: 1,02,
glutamová kyselina: 0,89,
3,3-dimethylprolin 1,02,
[α]_D²² + 5,9 %, (c = 1, dimethylformamid).

Příklad 4

L-Pyroglutamyl-N^ε-methyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolinamid.

I) Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-N^ε-methyl-L-histidin.

Podle tohoto provedení se N^ε-methyl-L-histidin v množství 428 g a uhličitan sod-

ný v množství 288 mg, rozpustí ve vodě v množství 5 mililitrů a hodnota pH tohoto roztoku se upraví na 8,5. K tomuto roztoku se potom přidá N-hydroxysuccinimidester kyseliny benzyloxykarbonyl-L-pyroglyutamové v množství 933 mg, v dioxanu v množství 5 ml, a takto získaný roztok se potom míchá po dobu 15 hodin při teplotě 22 °C.

Takto připravený roztok se odpaří, čímž se získá zbytek, který se podrobí chromatografickému rozdělování v koloně naplněné silikagelem (kolona 15 × 330 mm), přičemž se jako elučního činidla použije směs isopropanolu, ethylesteru kyseliny octové a vody v poměru 3:1:1:1, a po odpaření odpovídající frakce se získá konečný produkt ve formě bílé pevné hmoty.

Výtěžek 615 mg,
teplota tání 192 až 195 °C,
 R_F 3A: 0,21,
 R_F 3B: 0,69,
 $[\alpha]_D^{22}$ -1,3 °,
(c = 1, dimethylformamid).

(II) L-Pyroglyutamyl-N^ε-methyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolinamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z benzyloxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-N^ε-methyl-L-histidinu v množství 207 mg, a z trans-3-methyl-L-prolinamidu v množství 77 mg, stejným způsobem jako je uveden v příkladu 2 (VI), přičemž výsledným produktem je bílá hyroskopická pevná látka.

Výtěžek 90 mg,
teplota tání 135 až 140 °C,
 R_F 3B: 0,60,

Analýza: pro C₁₈H₂₃N₅O₄

nalezeno:
55,0 % C, 7,0 % H, 21,2 % N,

vypočteno:
55,4 % C, 6,7 % H, 21,5 % N.

$[\alpha]_D^{22}$ -23,9 °,
(c = 1, dimethylformamid).

Příklad 5

L-Pyroglyutamyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolincyklohexylamid.

I) t-Butyloxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolincyklohexylamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z t-butyloxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolinu (1,15 g) a cyklohexylaminu (2,85 ml) stejným způsobem jako je to uvedeno v příkladu 1 (II), přičemž výsledný produkt je ve formě bílé pevné hmoty. Výtěžek 1,3 g, teplota tání 130 až 134 °C, R_F 1F: 0,53.

II) trans-3-Methyl-L-prolincyklohexylamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z t-butyloxykarbonyl-trans-3-methyl-L-prolincyklohexylamidu (900 mg) stejným způsobem jako je uveden v příkladu 1 (III) a v příkladu 1 (IV), přičemž výsledným produktem je bílá pevná hmota.

Výtěžek 410 mg,
teplota tání 111 až 113 °C,
 R_F 2A: 0,33.

III) L-Pyroglyutamyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolincyklohexylamid.

Podle tohoto provedení se výše uvedená sloučenina připraví z benzyloxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-L-histidinu (565 mg) a z trans-3-methyl-L-prolincyklohexylamidu (300 mg) stejným způsobem jako je to uvedeno v příkladu 2 (VI), přičemž výsledný produkt se získá ve formě pevné bílé hmoty.

Výtěžek 272 mg,
teplota tání 145 až 150 °C,
 R_F 3A: 0,43,
 R_F 3B: 0,78,
 $[\alpha]_D^{22}$ -14,9 °,
(c = 1, dimethylformamid)
 R_F 4A: 0,50

Příklad 6

L-Pyroglyutamyl-L-histidyl-trans-3-methyl-L-prolinhexylamid.

Podle tohoto příkladu se výše uvedená sloučenina připraví stejným postupem jako je uveden v příkladu 5, přičemž výsledný produkt je ve formě bílého prášku.

R_F 4A: 0,52,
 R_F 3B: 0,82.

V postupech podle výše uvedených příkladů se chromatografie v tenké vrstvě provádí na plotech Kiesegel GF254 (což je silikagelový materiál), přičemž se použije následujících rozpouštědlových systémů:

- 1 E methanol, chloroform 1:4,
- 1 F methanol, chloroform 1:9,
- 2A chloroform, methanol, kyselina octová 18:2:1,
- 3A chloroform, methanol, kyselina octová, voda 80:18:2:3,
- 3B chloroform, methanol, kyselina octová, voda 30:20:4:6,
- 4A n-butanol, ethylester kyseliny octové, kyselina octová, voda 1:1:1:1,
- 6C n-butanol, pyridin, kyselina octová, voda 30:20:6:12,
- 7C ethylester kyseliny octové, pyridin, kyselina octová, voda 120:20:6:11.

Bylo zjištěno, že sloučenina podle příkladu 1, v případě, že byla testována na myších po ukončení testu reserpinem navozené hypotermie, podle postupu B. M. Askewa, Life Sci., 10, 725 (1963), projevuje významný ($P < 0,05$, Mann Whitneyův U test) účinek při kterém se vytváří teplo během 4 hodin u plně reserpinovaných myší.

Tato sloučenina je 3 až 4krát účinnější než TRH, v případě, že byla podána v dávkách 1 až 30 mg/kg p. o.

Therapeutické směsi podle uvedeného vynálezu mohou být ve formě vhodné pro orální podávání nebo ve formě vhodné pro pa-

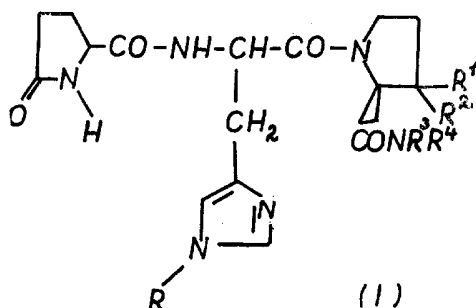
renterální podávání. Tyto směsi pro orální podávání mohou mít formu kapslí, tablet, granulí nebo kapalných přípravků, jako jsou například elixíry, sirupy nebo suspenze.

Směsi pro parenterální podávání mohou mít formu sterilních přípravků pro injekce jako jsou například roztoky ve vodě nebo v solném roztoku.

Je výhodné používat uvedené směsi ve formě jednotkové dávky, neboť tato forma je nejobvyklejší. Pro orální podávání obsahuje jednotková forma 1 miligram až 100 miligramů sloučeniny obecného vzorce I.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy L-pyroglutamyl-L-histidyl-3-alkylprolinamidových derivátů obecného vzorce (I):



ve kterém znamená

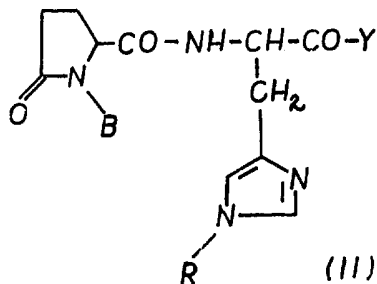
R atom vodíku nebo methylovou skupinu,

R¹ je alkylová skupina obsahující celkově 1 až 3 atomy uhlíku,

R² je atom vodíku nebo methylová skupina,

R³ představuje atom vodíku, alkylovou skupinu obsahující celkově 1 až 6 atomů uhlíku nebo cykloalkylovou skupinu obsahující celkově 3 až 6 atomů uhlíku, a

R⁴ je atom vodíku nebo methylová skupina, vyznačující se tím, že se do adiční reakce uvede sloučenina obecného vzorce (II):

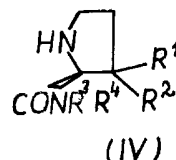


ve kterém znamená

B atom vodíku nebo benzyloxykarbonylovou skupinu,

R má výše uvedený význam a

Y je hydroxyskupina nebo azidová skupina, se sloučeninou obecného vzorce (IV):



ve kterém mají

R¹, R², R³ a R⁴ již shora uvedený význam, přičemž v případě kdy je substituentem B benzyloxykarbonylová skupina, následuje hydrogenace.

2. Způsob podle bodu 1, pro přípravu L-pyroglutamyl-L-histidyl-3-alkylprolinamidových derivátů obecného vzorce (I), ve kterém mají

R, R¹ a R² shora uvedený význam,

R³ je atom vodíku a

R⁴ je atom vodíku,

vyznačující se tím, že se do adiční reakce uvádí sloučenina obecného vzorce (II), ve kterém mají

R a Y již výše uvedený význam a

B je atom vodíku, se sloučeninou obecného vzorce (IV), ve kterém mají

R¹ a R² shora uvedený význam a

R³ je atom vodíku a

R⁴ je atom vodíku.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že v případě, kdy je substituentem Y hydroxyskupina, potom se adiční reakce provádí v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu a hydroxybenzotriazolu.