

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

209 931 B

(21) A bejelentés száma: 4585/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 07. 23.
(30) Elsőbbségi adatok:
385 624 1989. 07. 26. US

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 5/08

C 07 C 229/36

C 07 C 229/06

A 61 K 31/195

A 61 K 37/64

(40) A közzététel napja: 1991. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1994. 12. 28. SZKV 94/12

(72) Feltalálók:

Bey, Philippe, Cincinnati, Ohio (US)
Angelastro, Michael Richard, Loveland, Ohio (US)
Mehdi, Shujaath, Cincinnati, Ohio (US)
Peet, Norton Paul, Cincinnati, Ohio (US)

(73) Szabadalmaz:

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati,
Ohio (US)

(74) Képvisező:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás fluortartalmú peptidáz inhibitorok előállítására

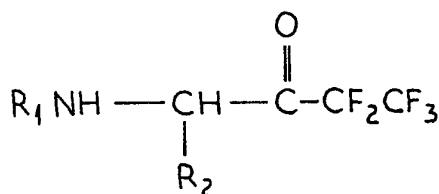
(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az új (I) általános képletű
vegyületek előállítására, ahol a képletben

R₁ jelentése Cbz vagy Boc amino-védőcsoport, vagy
ezeket tartalmazó -Val-Pro- peptid-csoport,

R₂ jelentése a Val vagy a Phe oldallánca.

A találmány szerinti eljárással előállított vegyü-
letek enzim inhibáló hatással rendelkeznek és gyógy-
szerészetben alkalmazhatók.



(1)

HU 209 931 B

A találmány tárgya eljárás új (1) általános képletű proteáz enzim inhibitorok előállítására, amelyek különféle fiziológiai alkalmazásra használhatók. A találmány szerinti eljárás során az (1) általános képletű vegyületeket a megfelelő alkohol oxidációjával állítjuk elő.

Tágabb értelemben a találmány tárgya eljárás peptidáz szubsztrátok előállítására, amelyekben a terminális karboxilcsoportot (7) képletű pentafluor-etil-karbonil-csoporttal helyettesítjük. Ezek a peptidáz szubsztrát analógok számos különböző proteáz inhibitorként alkalmazhatók, ami kiváló farmakológiai alkalmazhatóságot biztosít különféle betegségek kezelésében.

Részletesebben, a találmány tárgya eljárás bizonyos peptidáz szubsztrátok pentafluor-etil-karbonil-analógjainak előállítására, amelyek alkalmasak szerin-, karbonsav- és metallo-proteinázok inhibálására, ami számos betegség kezelésében való alkalmazásra alkalmasá teszi őket.

A találmány tárgya tehát eljárás peptidáz szubsztrátok pentafluor-etil-karbonil-analógjainak előállítására, amelyeket aktív kötőhelyeik leírása alapján az alábbi szerkezetekkel lehet jellemezni. A specifikus csoportok az alábbiak:

- I. Szerin proteinázok: ezek közé tartoznak az elasztáz (humán leukocita), katepszin G, thrombin, plazmin, C-1 észteráz, béta-laktamáz, D-alanin-D-alanin karboxipeptidáz, kimotripszin, tripszin és kallikrein enzimek.
- II. Karbonsav proteinázok, így a renin, pepszin és katepszin D enzimek.
- III. Metallo proteinázok, mint például az angiotenzin konvertáló enzim, enkefalináz, pseudomonász elasztáz és leucin aminopeptidáz enzimek.

A fenti enzimek peptidáz inhibitorai a találmány szerinti eljárással előállítható (1) általános képletű vegyületek, és gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sói, ahol az általános képletben

R_1 jelentése Cbz vagy Boc amino-védőcsoport, vagy a fenti védőcsoportokat tartalmazó -Val-Pro- peptid;

R_2 jelentése Val vagy Phe α -aminosav oldallánc.

A találmány szerinti peptidáz szubsztrát analógokban az alfa-aminosavak L-konfigurációjúak. Az ismert hárombetűs aminosav jelölések alkalmazása során, amennyiben az aminosav L-konfigurációjú, a hárombetűs kód első betűjét nagybetűvel írjuk, amennyiben az aminosav D-konfigurációjú, a kódot kisbetűvel kezdjük.

A találmány szerinti vegyületek lehetnek savaddíciós só formájúak, mely sók a szakirodalomból ismert eljárásokkal, a szabad formából bármely nem toxikus szerves vagy szervetlen savval reagáltatva állíthatók elő.

A találmány szerinti (1) általános képletű peptidáz inhibitorok további részletes leírása előtt néhány peptidkémiai ismeretet írunk le. Minden alfa-aminosav rendelkezik egy jellemző csoporttal, amely R csoport, vagy lánc az alfa-aminosav alfaszénatomjához kapcsolódik, mint például a valin esetében az izopropilcsoport. Az egyes alfa-aminosavak R-csoportjait A. L. Lehninger, Biochemistry (lásd a 4. fejezetet) közleményében részletesen leírta.

A leírásban alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

Phe fenilalanin

Val valin

5 Pro prolin

Cbz benziloxi-karbonil-csoport

Boc terc-butoxi-karbonil-csoport

Az (1) általános képletű vegyületek úgy is leírhatók, hogy ezek peptid származékok, amelyek a karboxilcsoport végükön módosítottak.

A találmány szerinti eljárással előállítható vegyületek többek között a humán leukocita elasztáz, katepszin G, thrombin, kimotripszin, tripszin, plazmin, C_1 -észteráz, C_3 konvertáz, urokináz, akrozin, béta-laktamáz, karboxi-peptidáz, cisz-transz izomeráz, renin, katepszin D, angiotenzin, enkefalináz, stb. enzimek gátlására alkalmazhatók.

Alkalmazásuk esetén az (1) általános képletű vegyületek enzim inhibáló jellemzőit a szakirodalomban ismert standard biokémiai eljárásokkal határozhatjuk meg. A vegyületek alkalmazott dózisa természetesen függ a betegség súlyosságától és fajtájától, melyet az orvos határoz meg. Általában 0,01–10 mg/kg testtömeg/nap, előnyösen 0,1–10 mg/kg testtömeg/nap dózis alkalmazható a fenti betegségek kezelésében.

Humán leukocita elasztáz enzimet a gyulladás helyén a többmagvú leukociták bocsátják ki, és így számos betegség együttjárója. Az (1) általános képletű vegyületek, köszvény, reumás ízületi gyulladás és más gyulladásos betegségek, valamint emphysema kezelésében alkalmazható gyulladásgátló hatással rendelkező anyagok.

Az (1) általános képletű vegyületek, amelyek a katepszin G enzimet inhibálják, hasonló betegségek esetében alkalmazhatók, mint a humán leukocita inhibitorok. Azaz alkalmazhatók ízületi gyulladás és emphysema kezelésére, ezen túlmenően alkalmazhatók tüdő fertőzés által okozott glomerulonephritis és tüdő elősdi kezelésére.

Az (1) általános képletű vegyületek továbbá inhibálják a thrombint, és így hasonlóan a heparin alkalmazásához, alkalmasak thrombotikus vénagyulladás és koszorúér thrombosis kezelésében kezdeti antikoaguláns szerként való alkalmazásra.

Az (1) általános képletű tripszint és kimotripszint inhibáló anyagok a hasnyálmirigy gyulladás kezelésére alkalmazhatók.

Az (1) általános képletű plazmint inhibáló vegyületek anti-proliferatív hatásúak és alkalmasak jóindulatú prosztata túltengés, és prosztata karcinóma, valamint psoriasis kezelésére.

Azok az (1) általános képletű vegyületek, melyek inhibálják a C_1 -észteráz, valamint a C_3 konvertáz enzimet lupus, ízületi gyulladás, autoimmun haemolitikus vérszegénység és glomerulonephritis kezelésére alkalmazhatók.

Az (1) általános képletű urokináz enzimet gátló vegyületek alkalmasak túlzott sejtnövekedéssel járó betegségek kezelésére. Mint ilyenek, alkalmasak jóindulatú prosztata túltengés és prosztata karcinóma, ps

riasis kezelésére, valamint magzatelhajtóként való alkalmazásra.

Azok az (1) általános képletű vegyületek, melyek inhibíálják a béta-laktamáz enzimet, alkalmasak antibakteriális szerek, elsősorban béta-laktám antibiotikumok hatásosságának növelésére.

Az (1) általános képletű vegyületek, melyek inhibíálják a renint, magas vérnyomás elleni szerként való felhasználásra, és amelyek a pepszint inhibíálják gyomorfekély ellenes szerként, gyomorfekély kialakulásának megakadályozására való felhasználásra alkalmasak.

Az (1) általános képletű katepszin D inhibáló hatású vegyületek alkalmasak ugyanazon betegségek kezelésére, mint a humán leukocita elasztázként való felhasználásnál leírtuk, valamint anti-demielináló szerként való alkalmazásra és idegszöveti károsodások kezelésére.

Az (1) általános képletű vegyületek, melyek inhibíálják az ACE angiotenzin enzimet, vérnyomáscsökkentő szerként, magas vérnyomás kezelésére alkalmasak.

Az enkefalináz enzimet gátló hatású (1) általános képletű vegyületek fájdalomcsillapító szerként használhatók.

Az (1) általános képletű vegyületek és előállítási eljárásuk kiindulási vegyületei a szakirodalomból ismert módszerekkel, például az A. reakcióvázlat – ahol P_g valamely lehasítható védőcsoport, R_1 és R_2 jelentése az (1) általános képletnél megadott – szerinti eljárással állíthatók elő.

A reakcióvázlat szerinti eljárás során a (2a) vagy (2b) általános képletű N-metoxi-N-metil-amid redukciójával állítjuk elő a (3a) vagy (3b) általános képletű aldehideket. Előnyösen a (2a) általános képletű vegyületeket alkalmazzuk kiindulási anyagként. A redukciót általában bármely, a szakirodalomban ismert eljárással, például lítium-alumínium-hidrid segítségével végezzük. A redukciót alkalmasan hűtött, általában körülbelül 0 °C-os (2a) vagy (2b) általános képletű vegyület inert oldószerben, mint például éter típusú oldószerben, például tetrahydrofuránban készült oldatához feleslegben alkalmazott lítium-alumínium-hidridet adva végezzük. Miután a reakció, jellemzően körülbelül 30 perc múlva teljesen befejeződik, a reakciót például 10%-os káliumhidrogénszulfát vizes oldat hozzáadásával leállítjuk. A terméket például a vizes elegyet etil-acetáttal extrahálva, majd az oldatot megszárítva, és az oldószert eltávolítva izolálhatjuk. A nyersterméket például szilikagélen, 55% etilacetát/hexán eluens alkalmazásával oszlopkromatográfia segítségével vagy átkristályosítással tisztíthatjuk.

A (3a) és (3b) általános képletű aldehideket ezután pentafluor-etil-anionnal reagáltatjuk, amely lehet például a pentafluor-etil-anion lítium sója és így a (4a), vagy (4b) általános képletű kiindulási alkoholokat állíthatjuk elő. A kondenzációt a szakember például P. G. Gasman és Neil J. O'Reilly, J. Org. Chem. 52, 2481–2490 (1987), közleményében leírt módosított eljárásával végezheti. Az eljárásban a perfluor-etil-aniont *in situ* állítjuk elő, metil-lítium) lítiumbromid komplexet

adagolva az aldehid és perfluor-etil-jodid inert oldószerbe, például dietil-éterben képzett oldatához. A hűtött reakcióelegyet (-78 °C – 0 °C) körülbelül 0,5–1 óráig keverjük, amíg a reakció befejeződik, majd felesleg híg sósavba öntve a reakciót leállítjuk. A terméket például dietil-éterrel extrahálva, majd az oldószert eltávolítva izolálhatjuk. A nyersterméket például szilikagélen végzett kromatográfia segítségével tisztítjuk.

Az így kapott (4a), vagy (4b) általános képletű alkoholokat ezután a találmány szerinti eljárásnak megfelelően ketonná oxidáljuk. Az oxidációt a jól ismert Swern oxidációs eljárással végezhetjük, vagy alkalmazhatunk módosított piridinium-dikromátot felhasználó Jones oxidációt, vagy krómsavanhidrid-piridinium komplexet alkalmazó oxidációt, vagy Dess-Martin perjodinánt, 1,1,1-trisz(acetiloxi)-1,1-dihidro-1,2-benzojodoxol-3(1H)-ont oxiládószerként.

A Swern oxidációt általában körülbelül 2–10 mol ekvivalens dimetilszulfoxid és körülbelül 1–6 mol ekvivalens trifluor-ecetsavanhidrid, vagy oxalil-klorid reakciójával végezzük. A fenti reakciókat inert oldószerben, például diklórmétánban, inert atmoszférát tartalmazó (például nitrogént, vagy más hasonló inert gázt) reaktorban, vízszintes körülmények között, körülbelül -80 °C – -50 °C hőmérsékleten oldjuk. Így *in situ* szulfonium adduktot képezzük, amelyhez ezután a megfelelő (4a) vagy (4b) általános képletű alkohol 1 ekvivalens mennyiségét adjuk.

Az alkoholokat előnyösen inert oldószerben, például diklórmétánban vagy minimális mennyiségű dimetilszulfoxidban oldjuk, és a reakcióelegyet hagyjuk körülbelül -50 °C-ra melegezni (körülbelül 10–20 percig), majd a reakciót körülbelül 3–10 mol ekvivalens terciér amin, például trietil-amin, N-metil-morfolin hozzáadásával teljessé tesszük. A módosított Jones oxidációt általában a (4a) vagy (4b) általános képletű alkoholt piridinium-dikromáttal reagáltatva végezzük. A reakciókat vízkötő molekulaszita (például 3 Ångström méretű porított molekulaszita) és jégcect jelenlétében körülbelül 0 °C – 50 °C, előnyösen szobahőmérsékleten reagáltatjuk, majd a terméket izoláljuk, és kívánt esetben az amin védőcsoportokat eltávolítjuk.

Más eljárásban inert oldószerben, például diklórmétánban, *in situ*, inert atmoszférában, vízmentes körülmények között, körülbelül 0 °C – 50 °C hőmérsékleten előállított 1–5 ekvivalens krómsavanhidrid piridin komplexet (lásd Sarett reagens *in situ* előállítása, Fieser and Fieser, „Reagents for Organic Synthesis” Vol. 1., pp 145; Sarett és mtsai, J. A. C. S., 25, 422, (1953) 1 mol ekvivalens (4a), vagy (4b) általános képletű vegyülettel reagáltatunk a fenti körülmények között körülbelül 1–15 óráig, majd a terméket izoláljuk, és az amincsoport védőcsoportokat eltávolítjuk.

Más eljárás szerint (4a) vagy (4b) általános képletű alkoholokat a kívánt (1) képletű ketonná alakítjuk Dess-Martin perjodinánt alkalmazó oxidációs reakcióban [lásd Dess-Martin, J. Org. Chem., 48, 4155 (1983)]. Az oxidációt körülbelül 1 mol ekvivalens (4a) vagy (4b) általános képletű alkoholt inert atmoszférá-

ban (például nitrogéngáz atmoszférában), vízmentes körülmények között, 0 °C – 50 °C hőmérsékleten (előnyösen szobahőmérsékleten), 1–5 mol ekvivalens (előnyösen 1,5 ekvivalens) perjodinán inert oldószerben (például diklórmétánban) készült szuszpenziójával reagáltatunk. A reakciót körülbelül 1–48 óráig folytatjuk. A ketonok izolálása után kívánt esetben az aminocsoport védőcsoportokat eltávolítjuk.

A találmány szerinti előnyös eljárásban a találmány szerinti vegyületeket úgy állítjuk elő, hogy először a végső oxidációt megelőzően a (4a) általános képletű aminocsoporton védett perfluor-etil-alkoholt a megfelelő (4b) általános képletű vegyületté alakítjuk. A (4a) általános képletű aminocsoporton védett perfluor-etil-alkoholból először az aminocsoport védőcsoportot eltávolítjuk, és amennyiben kívánatos ezután az R₁ csoportba értendő peptid-lánc beépítését a szokásosan alkalmazott alfa-aminosav peptiddé alakítási eljárással elvégezhetjük. Amennyiben az R₁ csoport több, mint egy aminosavból áll, a védőcsoport nélküli (4a) általános képletű vegyülethez, vagy az egész peptid-láncot kapcsolhatjuk, vagy az aminocsoportokat sorrendben kapcsolhatjuk a molekulához. Más eljárásban e két fenti eljárás kombinációját is alkalmazhatjuk.

Más eljárás szerint a (2a) és (2b) általános képletű vegyületek közvetlenül az (1) általános képletű vegyületekké alakíthatók az N-metoxi-N-metil-amid és a perfluor-etil-anion hasonló módon végzett kondenzációjával, mint amilyen kondenzációval a (2a) illetve (2b) általános képletű vegyületeket a (3a) illetve (3b) általános képletű vegyületekké alakítottuk.

A vegyületeket ezt követően standard eljárásokkal izoláljuk és tisztítjuk. A szükséges aminosavak, származékaik, izomerjeik kereskedelemben kaphatók, vagy a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal előállíthatók.

A (6a) és (6b) általános képletű N-metoxi-N-metil-amidokat a megfelelő alfa-aminosavakból a szokásos eljárással állíthatjuk elő. [Lásd például J. A. Fehrentz és B. Costra, *Synthesis*, 676–78 (1983) közleményében leírt eljárást.]

N-Metil-morfolin, avgy más sztéríkusan gátolt nem nukleofil terciér amin és a (6a), vagy (6b) általános képletű vegyület nem reaktív oldószerben, például diklórmétánban készült hideg (például -60 °C – körülbelül 0 °C-os) oldatához izobutil-klór-formiátot adunk. Körülbelül 5 perc-1 óra reakcióidő elteltével, jellemzően körülbelül 15–20 perc múlva az elegyhez N,O-dimetil-hidroxilamin-hidrokloridot adunk, majd a reakcióelegyet körülbelül 30 perc – körülbelül 6 óra ideig keverjük, majd hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. Amikor a reakció körülbelül 1–10 óra elteltével befejeződik az elegyet vízbe öntjük és a vizes fázist például etilacetáttal extraháljuk. A kívánt terméket az oldószer elpárologtatásával izoláljuk, majd például szilikagélén, etilacetát/hexán eluens alkalmazásával gyorskromatográfia segítségével tisztítjuk. A tisztítást például szilikagélén, diklórmétán eluens alkalmazásával végzett gyorskromatográfia segítségével is végezhetjük.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákön részletesen bemutatjuk. Az előállított vegyületek mole-

kulatömegét nagy felbontóképességű tömegspektrométerrel mértük.

1. példa

Cbz-Val-C₂F₅ előállítása

A. Cbz-Val(OH)-CF₂CF₃ előállítása

0,55 g Cbz-Val-H 8 ml dietiléterben készült oldatát -78 °C-ra hűtjük és 0,5 ml pentafluor-etil-jodidot adunk hozzá. A keverékhez 2,8 ml (1,5 molos éteres oldat) metillítium/lítumbromid komplex oldatot adunk, majd 0,5 óráig -78 °C-on keverjük. Ezután híg sósavba öntjük, majd a vizes elegyet kétszer 100 ml dietil-éterrel extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk, majd az oldószert vákuumban elpárologtatjuk és a nyerstermékek kromatográfia segítségével tisztítjuk. 97 mg címbeli terméket kapunk.

MS: 356 (M+H)⁺

A. Cbz-Val-CF₂CF₃ előállítása

0,03 ml oxalil-klorid 2 ml diklórmétánban készült oldatát -55 °C-ra hűtjük és 0,08 ml dimetilszulfoxidot adunk hozzá. Az elegyet 5 percig keverjük, majd 82 mg CBZVal/OH-CF₂CF₃ 1 ml diklórmétánban készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet 20 percig -55 °C-on keverjük, majd 0,5 ml trietilamint adunk hozzá és szobahőmérsékletre melegítjük. Ezután 100 ml vízbe öntjük, és etilacetáttal extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk, és vákuumban bepároljuk. A nyersterméket kromatográfia segítségével tisztítjuk, és 23 mg címbeli vegyületet kapunk.

2. példa

N-[(fenil-metoxi)-karbonil(-L-valil-)]N-metoxi-N-metil-L-fenil-alanil-amid

2,5 g (6,25 mmól) N-(N-(fenil-metoxi)-karbonil(-L-valil)-L-fenil-alanil-amid 25 ml diklórmétánban készült oldatához 1,5 ml N-metilmorfolint adunk. Az oldatot -15 °C-ra hűtjük, majd 0,8 ml izobutil-klór-formiátot adunk hozzá. A reakcióelegyet 20 percig keverjük, és ekkor 1,0 g N,O-dimetil-hidroxilamin-hidrokloridot adunk hozzá. Az oldatot 1 óráig -15 °C-on keverjük, majd további 3 óráig hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, és keverjük. A reakcióelegyet híg nátriumhidrogénkarbonát oldatba öntjük, majd háromszor 75 ml etilacetáttal extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk majd az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. A nyersterméket szilikagélén oszlopkromatográfia segítségével tisztítjuk. A kívánt terméket 57% etilacetát/hexán eluenssel vágott elúció során nyerjük. Termelés 1,8 g.

3. példa

N'-metoxi-N'-metil-L-N-[(fenil-metoxi)-karbonil]-fenil-alaninamid

25 g (0,084 mól) L-N-(fenil-metoxi)-karbonil-fenil-alanin 3000 ml diklórmétánban készült oldatához 18,4 ml (0,167 mól) N-metil-morfolint adunk, majd

-15 °C-ra hűtjük és 10,8 ml (83,6 mól) izobutil-klór-formiátot adunk hozzá. Az egyet 15 percig -15 °C-on keverjük, majd 8,5 g N,O-dimetil-hidroxilamin hidrokloridot adunk hozzá. Az reakcióelegyet 1 óráig -15 °C-on keverjük, majd hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni és 3 óráig ezen a hőmérsékleten keverjük. A reakcióelegyet ezután 300 ml vízbe öntjük és a vizes fázist kétszer 150 ml diklórmétánnal extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk, és térfogatát 100 ml-re bepároljuk, majd 25,4 mm szilikagél rétegen leszűrjük. A szilikagél 200 ml diklórmétánnal mossuk, majd az oldószert az egyesített szűrletből elpárologtatjuk. 26,14 g címbeli vegyületet kapunk.

4. példa

5-[(1,1-dimetil-etoxi)-karbonil-(amino)-6-[(metoxi-metil)-amino]-6-oxo-hexil-karbaminsav fenil-metil észter

10 g (26,3 mmól) N²-[(1,1-dimetil-etoxi)-karbonil]-N⁶-[(fenil-metoxi)-karbonil]-L-lizin diklórmétánban készült oldatát 0 °C-ra hűtjük és 9,15 ml diizopropil-etil-amint adunk hozzá. Az elegyhez ezt követően 3,4 ml (26,3 mmól) izobutil-klór-formiátot adunk és -15 °C-ra hűtjük, majd 15 percig keverjük. Ezt követően 2,7 g N,O-dimetil-hidroxil-amin-hidrokloridot adunk hozzá, és 2 óráig -15 °C-on keverjük. A reakcióelegyet hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, majd 18 óráig ezen a hőmérsékleten keverjük. A reakcióelegyet ezután 200 ml vízbe öntjük, és az elegyet kétszer 150 ml diklórmétánnal extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes magnéziumsulfáton megszáritjuk, és az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. 13,5 g nyersterméket kapunk. 3,0 g nyersterméket szilikagél oszlopkromatográfia segítségével, 50% etilacetát/hexán eluens alkalmazásával tisztítunk és 2,01 g kívánt terméket kapunk.

5. példa

N-[(fenil-metoxi)-karbonil]-L-valil-L-fenil-alaninal
3 g (6,8 mól) N-[(fenil-metoxi)-karbonil]-L-valil-N'-metoxi-metil-L-fenil-alaninamid 50 ml tetrahydrofuránban készült oldatát 0 °C-ra hűtjük és 250 mg lítium-alumínium-hidridet adunk hozzá. Az elegyet 30 percig 0 °C-on keverjük, majd a reakciót 10%-os kálium-hidrogénsulfát hozzáadásával leállítjuk. Az elegyet 400 ml vízbe öntjük és a vizes fázist háromszor 150 ml etilacetáttal extraháljuk. Az egyesített szerves oldatot vízmentes magnéziumsulfáton megszáritjuk és az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. A nyerstermékek szilikagél, 55% etilacetát/hexán alkalmazásával kromatográfia segítségével tisztítjuk és 1,6 g címbeli vegyületet kapunk.

6. példa

Boc-Val-CF₂-CF₃ előállítás

1,0 g (3,8 mmól) Boc-Val-N(OCH₃)CH₃ vegyületet oldunk 50 ml dietiléterben és az oldatot -78 °C-ra hűtjük. Ezután 1,5 ml (12,2 mmól) pentafluor-etil-jodidot adunk hozzá. Ezt követően 6,0 ml (9,0 mmól) 1,5 mó-

los lítiumbromid/metil-lítium komplex dietiléteres oldatát adjuk az elegyhez. Az elegyet 5 percig keverjük, majd vékonyrétegekromatográfia segítségével analizáljuk. A reakció nem fejeződött be. Az elegyhez további 0,75 ml pentafluor-etil-jodidot és 0,3 ml lítiumbromid/metil-lítium komplex oldatot adunk. Az elegyet ismét keverjük, majd vékonyrétegekromatográfia segítségével analizáljuk. A reakció 75% mértékben zajlott le, így az elegyhez további 0,75 ml pentafluor-etil-jodidot és 0,3 ml lítiumbromid/metil-lítium komplex oldatot adunk. Az elegyet még tíz percig keverjük, majd 200 ml vízbe öntjük. Ezután a vizes keveréket kétszer 150 ml dietiléterrel extraháljuk. Az egyesített extraktumot vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk, az oldószert vákuumban elpárologtatjuk és a nyersterméket háromszor 24 cm szilikagél oszlopon 10% etilacetát/hexán eluens alkalmazásával kromatográfia segítségével tisztítjuk. 900 mg címbeli vegyületet kapunk. MS = 320,1310 (számított: 320, 1285) (M+H)⁺

7. példa

Cbz-Phe-CF₂-CF₃ előállítása

0,57 g (1,7 mmól) Cbz-Phe-N(OCH₃)CH₃ vegyületet oldunk 25 ml dietiléterben és -55 °C-on 0,75 ml (6,1 mmól) pentafluor-etil-jodidot kondenzálunk és adunk a hideg elegyhez. Ezután 3,0 ml (4,5 mmól) metil-lítium/lítiumbromid komplexet adunk hozzá és 15 percig keverjük. A hűtőfűdőt eltávolítjuk és az elegyet 20 percig keverjük, miközben szobahőmérsékletre melegszik. A reakcióelegyet ezután híg sósavba öntjük és háromszor 50 ml dietiléterrel extraháljuk. Az éteres extraktumot egyesítjük, és vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk, majd vákuumban bepároljuk. A nyersterméket 3 cm × 20 cm szilikagél oszlopon, 20% etilacetát/hexán eluens alkalmazásával, kromatográfia segítségével tisztítjuk. A kapott nyersterméket újra 20% etilacetát/hexán elegyben oldjuk és 2 cm/22 cm szilikagél oszlopon újra kromatografáljuk. Körülbelül 20 ml térfogatú frakciókat szedünk, miután az értékelten térfogatot eldobtuk. Termelés 285 mg.

MS = 368, 1254 (számított: 368, 1285) (M+H)⁺

8. példa

Boc-Val-Pro-Val-CF₂CF₃ előállítása

100 ml etilacetátban Boc-Val-CF₂-CF₃ vegyületet oldunk és 0 °C-ra hűtünk. Az elegyet 5 percig sósavgázzal kezeljük, majd 20 percig 5 °C-on keverjük. (A kiindulási anyag vékonyrétegekromatográfias analízis szerint eltűnik.) Ezután az oldószert rotációs bepárlón elpárologtatjuk, és a nyers sósavas sót tisztítás nélkül alkalmazzuk a következő lépésben.

Külön lombikban 0,54 g (1,7 mmól) Boc-Val-Pro-OH vegyületet oldunk 6 ml diklórmétán és 0,55 ml (5,1 mmól) N-metil-morfolin elegyében, és az elegyet -22 °C-ra hűtjük. Ehhez az elegyhez 0,22 ml (1,7 mmól) izobutil-klór-formiátot adunk, és az elegyet 25 percig -22 °C-on keverjük. Ezután hozzáadjuk a sósavas sójához (amelyet az előző bekezdésben leírtak szerint állítottunk elő), amit előzetesen 10 ml diklórmétánban szuszpendáljuk. A reakcióelegyet 1,5 óráig

keverjük, majd 100 ml vízbe öntjük. A vizes elegyet 2×100 ml dietiléterrel extraháljuk. Az éteres extraktumot egyesítjük és híg sósavval, majd nátriumhidrogén-karbonát oldattal mossuk, és vízmentes nátriumsulfáton megszáritjuk. Az oldószert elpárologtatjuk, és 660 mg nyerstermékek kapunk. A terméket $13 \text{ cm} \times 24 \text{ cm}$ szilikagél oszlopon, 20% etilacetát/hexán eluens alkalmazásával gyorskromatográfia segítségével tisztítjuk.

MS = 516, 2529 (számított: 516, 2496) (M+H)⁺

Az alábbiakban ismertetjük a biológiai vizsgálatokat és referenciákat, amelyekkel a találmány szerinti vegyületek biokémiai hatásosságát kimutattuk.

Például a humán elasztáz *in vitro* vizsgáltuk, amely vizsgálatban kronofon peptidokat, szukcinil-alanil-alanil-alanil-p-nitro-anilidet (A1), metoxi-szukcinil-alanil-alanil-prolil-valil-p-nitro-anilidet (A2), és másokat alkalmazunk, amelyek kereskedelembe kapható vegyületek. A tesztvizsgálati puffer 8,0 pH, és a vizsgálati körülmények hasonlóak a Lotterberg és munkatársai (A3, A4) által leírtakkal. Az enzimet humán sputumból tisztítjuk (A5), habár már kereskedelembe is kaphatóvá vált. Az azonnali inhibíció kinetikus jellemzését Dixon görbével (A6), míg a lassú és/vagy szorosan kötődő inhibitorok kinetikáját Williams és Morrison által alkalmazott eljárással (A7) határozzuk meg.

Hasonlóan más proteázok vizsgálatát és az inhibitorok hatását *in vitro* analóg spektroszkopikus eljárásokkal végezzük: katepszin G (A2); thrombin (A3); kimotripsin (A8); tripsin (A9); plazmin (A3); C1 észteráz (A10); urokináz (A3); plezminogén aktivátor (A11); akrozin (A12); béta-laktamáz (A13); katepszin B (A14); pepszin (A15); katepszin D (A16); és leucin aminopeptidáz (A17). A pszeudomonasz elasztáz esetében kapcsolt tesztvizsgálatot alkalmaztunk, amelyben humán elasztáz szubsztátot és mikroszoma aminopeptidáz alkalmaztunk.

Az angiotenzin I-konvertáló enzim és az enkefalináz, valamint inhibitoraik radioimmun tesztvizsgálatát Ryan eljárása (A18) szerint végeztük és Ventrex Laboratories Inc. tríciummal jelzett szubsztátokat alkalmaztunk. A radiocimmun vizsgálatot renin esetében is elvégeztük (A19). A C3-konvertáz enzim méréseket Tack és mtsai. eljárása (A20) szerint végeztük.

Az egyes tesztvizsgálati referenciákat az alábbiakban soroljuk fel.

A1. Nagyban érzékeny és alkalmas elasztáz szubsztát szintézise és analitikai felhasználása. J. Beith, B. Spiess és C. G. Wermuth, *Biochemical Medicine*, 11 350–375 (1974).

A2. A katepszin G és humán leukocita elasztáz kiterjesztett szubsztát helyének leképezése. Alfa 1-proteáz inhibitor aktív helyekkel kapcsolatos peptid szubsztátok vizsgálata. K. Nakajama, J. C. Powers, B. M. Ashe és M. Zimmetmen, *The Journal of Biological Chemistry*, 254 4027–4032 (1979).

A3. Koagulációs proteáz vizsgálatok, amelyekben peptid kromogén és fluorogén szubsztátokat alkalmazunk. R. Lettenberg, U. Christensen, C. M. Jackson és

P. L. Coleman, *Methods in Enzymology* (L. Lorand ed.), Academic Press, New York, 80, 341–361 (1979).

A4. Az oldat összetétel függő extinkció koefficiens változás p-nitro-anilin esetében. R. Lettenberg és C. M. Jackson, *Biochimica and Biophysica Acta*, 742 558–564 (1983).

A5. Elasztáz és katepszin G humán septumból való gyors és nagy mennyiségű tisztítási eljárása. R. R. Martodam, R. J. Baugh, D. Y. Twumasi és I. E. Leiner, *Preparative Biochemistry*, 9 15–31 (1979).

A6. Enzim inhibitor konstansok meghatározása. M. Dixon, *The Biochemical Journal*, 55 170–171 (1953).

A7. Reverzibilis szoros kötési inhibíció kinetikája. J. W. Williams és J. F. Morrison, *Methods in Enzymology* (D. L. Purich ed.), Academic Press, New York, 63., 437–467 (1979).

A8. Két alkalmas spektrometriás enzim tesztvizsgálata. Biokémia kinetikai kísérlet. J. A. Hurlbut, T. N. Ball, H. C. Pound és J. L. Graves, *Journal of Chemical Education*, 50 149–151 (1973).

A9. Tripszin két új kromogén szubsztátjának előállítása és jellemzői. B. F. Erlanger, N. Kokowsky és W. Cohen, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95 271–278 (1961).

A10. Szerin proteáz Clr és Cls humán komplement rendszer és proenzimjeik. R. B. Sim, *Methods in Enzymology*, (L. Lorand ed.), Academic Press, New York, 80., 26–42 (1979).

A11. Külső plazminogén aktivátor és urokináz. J. H. Verheijen, C. Kluft, G. T. G. Chang és E. Mullaart, *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassel, Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 425–433 (1984).

A12. Sperma akrozin. W. Mueller-Esterl és H. Fritz, *Methods in Enzymology* (L. Lorand ed.), Academic Press, New York, 80., 621–632 (1979).

A13. Új eljárás béta-laktamázok detektálására kromogén cefalosporin szubsztát alkalmazásával. C. H. O'Callaghan, A. Morris, S. M. Kirby és A. H. Shingler, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1 283–288 (1972).

A14. Katepszin B, Katepszin H és Katepszin L. A. J. Barrett és Kirschke. *Methods in Enzymology* (L. Lorand ed.), Academic Press, New York, 80., pp. 535–561 (1979).

A15. Pepszinek, gasztrikszinek és előenzimjeik. A. P. Ryle, *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassl eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 223–238 (1984).

A16. Katepszin D, Katepszin E. V. Turk, T. Lah és I. Kregar, *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassl, eds.) Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 5., 211–222 (1984).

A17. Aminosav arilamidáz. J. C. M. Hafkenscheid, *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassl, eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 5., 11–15 (1984).

A18. Angiotenzin I kovertáló enzim (kinináz II). J. W. Ryan, *Methods in Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassl, eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 5., 20–34 (1984).

A19. Renin. T. Inagami és M. Naruse, *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer és M. Grassl, eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 3rd. ed., 5., 249–258 (1984).

A20. A humán komplementum harmadik, negyedik és ötödik komponense: izolálása és biokémiai jellemzői. B. F. Tack, J. Janatova, M. L. Thomas, R. A. Harrison, és C. H. Hammer, *Methods in Enzymology* (L. Lorand, ed.) Academic Press, New York 870., 64–101 (1979).

A fent leírt eljárásokat, valamint más ismert eljárásokat alkalmazva és ismert vegyületekkel összehasonlítva, amelyek a fenti betegségek kezelésére alkalmazsak kimutattuk, hogy a találmány szerinti vegyületek alkalmasak a szakirodalomban ismert módszerekkel használva a betegségek kezelésére. Természetesen a végső felhasználáshoz a találmány szerinti vegyületeket előnyösen például orális adagolásra tabletta, kapszula, vagy elixír, parenterális úton történő adagolásra steril oldat, vagy szuszpenzió formában alkalmazzuk. A találmány szerinti vegyületeket a kezelést igénylő betegeknek (embereknek, vagy állatoknak) 5–500 mg/beteg dózisban többször adagolva, összesen 5–2000 mg/nap dózist adagolva adjuk. Mint fent leírtuk az adagolt dózis függ a betegség súlyosságától, a beteg súlyától és más tényezőktől, amelyet a szakember könnyen felismer.

A találmány szerinti vegyületeket jellemzően az alább leírt módon formáljuk.

Körülbelül 10–500 mg (I) általános képletű vegyületet, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóját elegyítjük gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal, töltőanyaggal, kisserelő anyaggal, kötőanyaggal, tartósító anyaggal, stabilizálószerrel, ízesítőanyaggal, stb. és egységdózist állítunk elő, amely a gyógyszerészeti gyakorlatban alkalmazható. A formált alakokban az aktív hatóanyag mennyisége olyan, hogy a fent jelzett dózis adagolása lehetővé váljon.

A tabletta, kapszula és hasonló formált alakokban alkalmazható segédanyagok például: kötőanyagok, például tragakant, akácia, kukoricakeményítő, vagy zselatin; kisserelő anyag, mint például mikrokristá-

lyos cellulóz; dezintegráló szer, például kukoricakeményítő, előzselatinizált keményítő, alginsav s hasonló; kenőanyag, például magnéziumsztearát; édesítő anyag például szukróz, laktóz, vagy szacharin; ízesítő anyag, például menta, gaulteria olaj, vagy cseresznyeíz. Amennyiben az egységdózis forma kapszula ez a fenti anyagokon túlmenően folyékony hordozót, mint például zsírolajat is tartalmazhat. Más anyagok is lehetnek jelen a formált alakban, például a bevonatban, vagy más fizikai állapotot módosító segédanyagként. Például a tabletta formált alak shellakkal, cukorral, vagy mindkettővel bevont forma lehet. A szirup, vagy elixír formált alak az aktív hatóanyagot és szacharózt mint édesítőszert, metil- és propilparabént mint tartósító szert, és festékanyagot, ízesítőanyagot, mint például cseresznye, vagy narancs ízesítőt tartalmazhat.

A steril injektálásra alkalmas formált alakot, a szokásos gyógyszerészeti eljárással az aktív hatóanyagot hordozóanyagban, például injektálásra alkalmas vízben, természetes növényi olajban, mint szezámolajban, kókuszolajban, mogyoró olajban, gypotolajban, stb., vagy szintetikus zsírolajban, például etil-oleátban, vagy hasonlóban oldva, vagy szuszpendálva állítjuk elő. A formált alakban puffereket, tartósító anyagokat, antioxidánsokat és hasonlókat is keverhetünk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

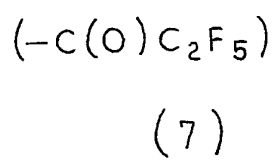
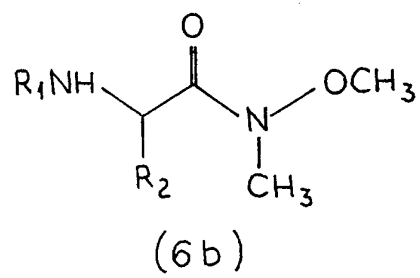
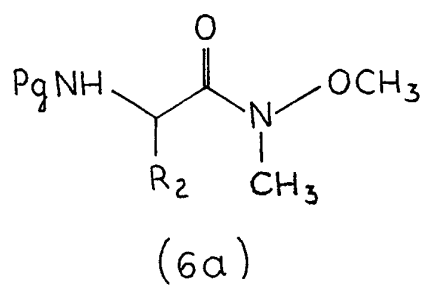
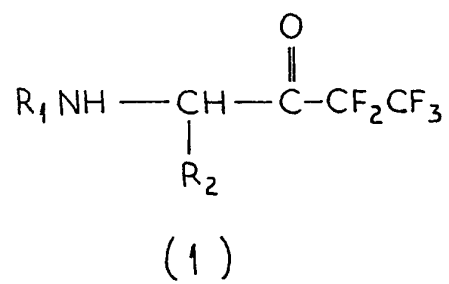
1. Eljárás (1) általános képletű vegyületek és gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sóik előállítására, ahol az általános képletben

R₁ jelentése Cbz vagy Boc amino-védőcsoport, vagy ezekkel a védőcsoportokkal ellátott -Val-Pro- peptid-csoport,

R₂ jelentése a Val vagy a Phe oldallánca, azzal jellemezve, hogy

a megfelelő (1) általános képletű alkoholt oxidáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás Boc-Val-Pro-Val-CF₂CF₃ előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási vegyületet alkalmazzuk.



A. Reakcióvázlat

