



A OBJEVY
ORAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223405
(11) (B1)

[51] Int. C1.³
C 07 C 103/52
//A 61 K 37/02

(22) Přihlášeno 13 10 80
(21) [PV 6905-80]

(40) Zveřejněno 29 10 82

(45) Vydáno 15 03 86

(75)
Autor vynálezu

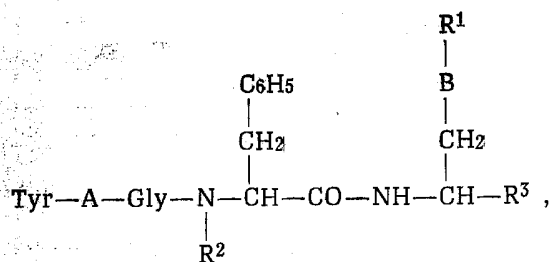
KASAFÍREK EVŽEN ing. CSc., DLABAČ ANTONÍN MUDr. CSc.,
KUŽÍLEK VLADIMÍR ing., ROUBALOVÁ ALENA, FRÍČ PŘEMYSL
doc. MUDr. DrSc., PRAHA

(54) Deriváty pentapeptidů s účinkem podobným morfinu

1

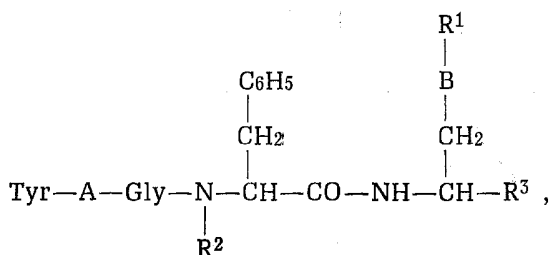
2

Vynález se týká nových derivátů pentapeptidů s účinkem podobným morfinu, obecného vzorce



ve kterém R^1 je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, R^2 je atom vodíku, R^3 je karboxyl nebo aminokarbonyl, A je zbytek glycinu, D-alaninu, D-methioninu nebo D-leucinu, B je atom síry nebo sulfoskupina. Tyto nové látky se připravují obecnými metodami používanými v chemii peptidů z vhodně substitovaných derivátů aminokyselin. Deriváty pentapeptidů uvedeného obecného vzorce vykazují biologickou aktivitu různých typů, zejména účinnost analgetickou a spasmolytickou, působení na hypothalamo-hypofyzární systém ve smyslu stimulace nebo inhibice sekrece hormonů atd.

Vynález se týká peptidů s biologickou účinností obecného vzorce



ve kterém R^1 je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, R^2 je atom vodíku, R^3 je karboxyl nebo aminokarbonyl, A je zbytek glycinu, D-alaninu, D-methioninu nebo D-leucinu, B je atom síry nebo sulfoskupina.

Je známo, že tzv. methionin-enkefaliny, zpravidla pentapeptidy, mají biologickou aktivitu podobnou morfinu.

Je prokázáno, že poloha 2 a 5 zmíněných peptidů významně ovlivňuje biologickou aktivitu. Vhodné obměny v těchto polohách zvyšují biologickou aktivitu o několik řádů a umožňují jinou než intracerebrální aplikaci.

S překvapením bylo zjištěno, že substituce methioninu v poloze 5 deriváty cysteinu s vhodnou kombinací v poloze 2 poskytují analogy methionin-enkefalinu s vysokou biologickou účinností umožňující intravenózní anebo dokonce perorální aplikaci, což je z terapeutického hlediska velmi výhodné.

Syntéza peptidů s biologickou účinností podle vynálezu je uskutečněna například fragmentovou kondenzací v roztoku, ale lze ji stejně uskutečnit postupnou aminokyselinovou výstavbou, tzv. „step-wise“ metodou nebo syntézou na pevném nosiči.

Jako chránicích skupin lze výhodně použít labilních skupin v slabě kyselém prostředí, například terc.butyloxykarbonylové nebo formylové. Kondenzační reakce byly provedeny karbodiimidovou metodou a metodou aktivních esterů.

Nové látky podle vynálezu vykazují obdobně jako analogické známé látky této skupiny více druhů biologické aktivity. Zejména pozoruhodná a použitelná je účinnost podobná morfinu, například analgetická, spasmolytická, ovlivnění hypothalamo-hypofysárního systému ve smyslu stimulace anebo inhibice hormonů, ovlivnění funkce digestivních hormonů a enzymů, střevní motility a řadu dalších.

Biologická aktivita byla sledována in vitro inhibicí stimulovaného morčecího ilea. Látka s isosterním methioninem (S-ethylcysteinem) vykazuje vysokou aktivitu; v kombinaci s D-alaninem v poloze 2 se získá látka s účinností řádově vyšší než methionin-enkefalin.

V pokusech in vivo, v Haffnerově testu analgesie, vykazoval analog tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcystein ještě v

dávce 2 μg /myš spolehlivou aktivitu. Ještě vyšší aktivitu vykazoval odpovídající amid, tj. tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinamid. Jako referenční látka sloužil známý derivát methioninu.

Výběr chránicích skupin a kondenzačních metod je detailně ilustrován příklady; v žádném případě však nevyčerpávají další možné syntetické způsoby, jak co do chránicích skupin, tak i co do syntetických metod, které by způsob výroby nových peptidů s opiátovým účinkem omezovaly.

Poznámka k příkladům: Veškeré odpařování bylo prováděno za sníženého tlaku. Složení vyvíjecích soustav v chromatografii na tenké vrstvě: S_1 = n-butanol — kyselina octová — voda (4 : 1 : 1), S_2 = n-butanol — kyselina octová — pyridin — voda (15 : 3 : 10 : 6).

Příklad 1

Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcystein

a) Methylester formylfenylalanyl-S-ethylcysteinu

K roztoku formylfenylalaninu (3,52 g; 20 mmolů) a 1-hydroxybenzotriazolu (4,8 g) v dimethylformamidu (20 ml) byl přidán roztok methylesteru S-ethylcysteinu v dimethylformamidu (20 ml) uvolněný z příslušného hydrochloridu (4,0 g; 20 mmolů) N-ethylpiperidinem (2,9 ml). Ke směsi vychlazené na 0 °C byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (4,4 g) a směs byla míchána 2 hodiny při 0 °C a potom ponechána při teplotě místnosti (12 hodin). Potom byla vyloučena N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována; filtrát byl odpařen, odparek rozpuštěn v octanu éthylnatém (150 ml) a vodě (20 mililitrů), organická fáze byla postupně vytřepána 3krát 1% kyselinou citrónovou, vodou, 3krát 5% hydrogenuhličitanem sodným, vodou, vysušena síranem sodným a odpařena. Odparek byl krystalován z octanu éthylnatého (60 ml) a petroletheru (180 ml). Bylo získáno 5,24 g produktu o t. t. 109 až 110 °C, $[\alpha]_D^{20} = -26,96$ ($c = 0,2$, methanol), $R_f = 0,84/\text{S}_1; 0,83/\text{S}_2$.

b) Methylester terc.butyloxykarbonyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-methylderivát uvedený v příkladu 2 ve výťažku 60 % a s t. t. 72 až 75 °C, $[\alpha]_D^{20} = -31,48^\circ$ ($c = 0,2$; methanol), $R_f = 0,92/\text{S}_1; 0,87/\text{S}_2$.

c) Hydrochlorid methylesteru fenylalanyl-S-ethylcysteinu

K roztoku methylesteru formylfenylalanyl-S-ethylcysteinu (1,7 g, 5 mmolů) v me-

thanolu (15 ml) byl přidán roztok 6,59 M kyseliny chlorovodíkové v tetrahydrofuranu (15 ml) a reakční směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem. Potom byl reakční roztok odpařen a odparek byl převrstven etherem (50 ml). Druhý den byl krystalický odparek odfiltrován, promyt etherem, vysušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným. Bylo získáno 1,71 g (98 %) produktu o t. t. 147 až 150 °C, $[\alpha]_D^{20} = -15,62^\circ$ ($c = 0,2$; methanol), $R_f = 0,61/S_1$; 0,76/S₂.

K roztoku methylesteru terc.butyloxykarbonylfenylalanyl-S-ethylcysteinu (2,05 g, 5 mmolů) v kyselině octové (10 ml) byl přidán roztok 1,97 M kyseliny chlorovodíkové v kyselině octové (10 ml). Po 90minutovém míchání při teplotě místnosti, byl roztok odpařen, odparek vysrážen etherem (50 ml), krystalický produkt odfiltrován, promyt etherem a vysušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným. Bylo získáno 1,40 g (80 %) produktu o t. t. 145 až 148 °C.

d) Methylester terc.butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

K roztoku hydrochloridu methylesteru fenylalanyl-S-ethylcysteinu (1,3 g; 3,5 mmolů) v dimethylformamidu (10 ml) byl přidán N-ethylpiperidin (0,5 ml) a terc.butyloxykarbonyl-glycylglycin (1,52 g, 3,5 mmolů) v dimethylformamidu (10 ml). Po ochlazení reakční směsi na 0 °C byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (0,8 g) a reakční směs byla 2 hodiny míchána při 0 °C. Po 12hodinovém stání při teplotě místnosti byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, filtrát byl odpařen, odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém a organická fáze byla postupně vytřepána 10% kyselinou citrónovou, vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným, vodou, vysušena síranem sodným, odpařena a odparek byl krystalován z octanu ethylnatého a petroletheru. Bylo získáno 1,27 g (69 %) produktu o t. t. 150 až 155 °C, $[\alpha]_D^{20} = -23,21^\circ$ ($c = 0,2$; methanol), $R_f = 0,80/S_2$.

e) Hydrochlorid methylesteru glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

K roztoku methylesteru terc.butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu (1,05 g, 2 mmoly) v kyselině octové (5 ml) byl přidán roztok 1,97 M kyseliny chlorovodíkové v kyselině octové (5 ml) a reakční roztok byl míchán 90 minut při teplotě místnosti, potom byl odpařen, odparek byl převrstven etherem, krystalický produkt odfiltrován a krystalován z methanolu (5 ml) a octanu ethylnatého (30 ml). Po 12hodinovém stání při +3 °C byl produkt odfiltrován, promyt octanem ethylnatým, etherem a vysušen v exsikátoru nad hydroxidem sodným. Bylo získáno 0,82 g (89 %) homogen-

ního produktu o t. t. 205 až 209 °C, $[\alpha]_D^{20} = -24,56^\circ$ ($c = 0,2$; methanol), $R_f = 0,35/S_1$; 0,74/S₂.

f) Methylester terc.butyloxykarbonyl-tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

K roztoku hydrochloridu methylesteru glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu (0,69 gramu, 1,5 mmolů) v dimethylformamidu (10 ml) byl přidán N-ethylpiperidin (4,4 ml 5% roztoku v dimethylformamidu) a hydroxysukcinimidester terc.butyloxykarbonyltyrosinu (0,57 g) a reakční roztok byl ponechán 2 dni při teplotě místnosti. Potom byl roztok odpařen, odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém a organická fáze byla postupně protřepána 10% kyselinou citrónovou, vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným, vodou, vysušena síranem sodným a odpařena. Odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém (3 ml) a za míchání vlit do petroletheru (50 ml). Bylo získáno 0,59 g o t. t. 105 až 107 °C, $[\alpha]_D^{20} = -14,7^\circ$ ($c = 0,2$; methanol), $R_f = 0,89/S_1$, 0,86/S₂.

g) Terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcystein

K roztoku methylesteru terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu 1,04 g, 1,5 mmolů) v methanolu (25 ml) a vody (9 ml) byl přidán 1 M roztok hydroxidu sodného (4,3 ml). Po 1hodinovém míchání byl z reakčního roztoku odpařen methanol, pH roztoku upraveno na 2,5 (cca 3 ml 20% roztoku hydrogen síranu sodného), vyloučený produkt byl vyjmut octanem ethylnatým a organická fáze byla protřepána vodou, vysušena síranem sodným, odpařena a odparek byl rozpuštěn v octanu ethylnatém (3 ml) a za míchání byl vlit do petroletheru (50 ml). Bylo získáno 760 mg (75 %) produktu o t. t. 122 až 126 °C.

h) Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcystein

K roztoku terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu (630 mg, 0,9 mmolů) v kyselině octové (3 ml) byl přidán 1,97 M roztok chlorovodíku v kyselině octové (3 ml). Po 90 min. míchání při teplotě místnosti byl reakční roztok odpařen a převrstven etherem; vyloučená látka byla odfiltrována, promyta etherem a krystalována z methanolu a etheru. Bylo získáno 570 mg produktu o t. t. 143 až 148 °Celsia. $R_f = 0,62/S_1$; 0,69/S₂.

Příklad 2

Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalamyl-S-methylcystein

a) Methylester terc.butyloxykarbonyl-fenylalanyl-S-methylcysteinu

K roztoku terc.butyloxykarbonylfenylalaninu (2,7 g, 10 mmolů) v methylenchloridu (30 ml) byl přidán roztok methylesteru S-methylcysteinu v methylenchloridu (15 ml) uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu (2,01 g, 10 mmolů) roztokem amoniaku v chloroformu. K vychlazenému roztoku na 0 °C byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (2,2 g) a směs byla míchána 2 hodiny při 0 °C a potom ponechána přes noc při teplotě místnosti. Druhý den vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, filtrát byl odpařen, odparek rozpuštěn v octanu ethylnatém a organická fáze postupně vytřepána 1% kyselinou citrónovou, vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným, vodou, vysušena síranem sodným, odpařena a odparek byl krystalován z octanu ethylnatého a petroletheru. Bylo získáno 2,14 g (54 procenta) produktu o t. t. 77 až 79 °C, $[\alpha]_D^{20} = -32,9^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,92/S₁; 0,87/S₂.

b) Hydrochlorid methylesteru fenylalanyl-S-methylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát z terc.butyloxykarbonyl- nebo z formylpeptidu, jak je uvedeno v příkladu 1 ve výtěžku 64 %, resp. 72 % o t. t. 142 až 147 °C, $[\alpha]_D^{20} = -21,92^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,57/S₁; 0,76/S₂.

c) Methylester terc.butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-methylcysteinu

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 69 % a s t. t. 153 až 155 °C, $[\alpha]_D^{20} = -23,21^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,80/S₂.

d) Hydrochlorid glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-methylcysteinu

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 88 % a s t. t. 190 až 192 °C, $[\alpha]_D^{20} = -29,06^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,28/S₁; 0,70/S₂.

e) Methylester terc.butyloxykarbonyl-tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-methylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 67 % a s t. t. 105 až 108 °C.

f) Terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-methylcystein

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 61 % a s t. t. 108 až 111 °C.

g) Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-methylcystein

Byl připraven obdobně z odpovídajícího terc.butylopentapeptidu jako S-ethylderivát ve výtěžku 59 % a s t. t. 147 až 150 °C.

Příklad 3

a) Methylester terc.butyloxykarbonyl-fenylalanyl-S-butylcysteinu

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 51 % a s t. t. 58 až 60 °C, $[\alpha]_D^{20} = -27,29^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,92/S₁; 0,87/S₂.

b) Methylester formylfenylalanyl-S-butylcysteinu

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 85 % a s t. t. 93 až 97 °C, $[\alpha]_D^{20} = -23,64^\circ$ (c = 0,2; methanol).

c) Hydrochlorid methylesteru fenylalanyl-S-butylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát v příkladu 1 ve výtěžku 88 % a s t. t. 130 až 132 °C.

$[\alpha]_D^{20} = -8,32^\circ$ (c = 0,2; methanol), Rf = 0,69/S₁; 0,76/S₂.

d) Methylester terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-butylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát v příkladu 1 z terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycinu a hydrochloridu methylesteru fenylalanyl-S-butylcysteinu ve výtěžku 73 % a s t. t. 161 až 165 °C.

e) Methylester terc.butyloxykarbonyltyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-butylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát v příkladu 1 s t. t. 94 až 97 °Celsia.

f) Terc.butyloxykarbonyltyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-butylcystein

Byl připraven obdobným způsobem jako S-ethylderivát v příkladu 1 s t. t. 123 až 126 °Celsia, $[\alpha]_D^{20} = +2,23^\circ$ (c = 0,2; methanol).

g) Tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-butylcystein

Byl připraven obdobně jako S-ethylderivát v příkladu 1 s t. t. 134 až 138 °C.

Příklad 4

Amid tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

- a) Methylester terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako S-butylderivát v příkladu 3d z terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycinu a hydrochloridu methylesteru fenylalanyl-S-ethylcysteinu ve výtěžku 76 % teorie, t. t. 110 až 114 °C.

- b) Amid terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

1,08 g methylesteru terc.butyloxykarbonyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu bylo rozpuštěno v 80 ml 15% amoniakálního methanolu a vzniklý roztok ponechán 3 dny při teplotě místnosti, potom byl vakuově odpařen a odparek byl krystalován z methanolu a etheru. Bylo získáno 900 mg (86 % teorie) produktu o t. t. 108 až 112 °C.

- c) Hydrochlorid amidu D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako methylester tetrapeptid S-ethylcysteinu v příkladu 1e ve výtěžku 68 % teorie, t. t. 115 až 120 °C.

- d) Amid terc.butyloxykarbonyl-tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven z hydroxysukcinimidesteru terc.butyloxykarbonyltyrosinu a hydrochloridu odpovídajícího tetrapeptidamidu obdobným způsobem jako v příkladu 1f ve výtěžku 57 % teorie, t. t. 123 až 127 °C.

- e) Hydrochlorid amidu tyrosyl-D-alanyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem z chráněného amidu pentapeptidu jako v příkladu 1h ve výtěžku 62 % teorie, t. t. 177 až 183 °C.

Příklad 5

Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinsulfoxid

- a) Terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinsulfoxid

100 mg terc.butyloxykarbonyltyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu (viz

příklad 1g) bylo rozpuštěno v 5 ml methanolu a k roztoku bylo přidáno 0,1 ml 30% peroxidu vodíku. Po 2 hodinách míchání při teplotě místnosti byl reakční roztok vakuově odpařen, odparek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu a produkt byl vysrážen 20 ml etheru. Bylo získáno 80 mg produktu o t. t. 101 až 104 °C.

- b) Tyrosyl-glycyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinsulfoxid

Odstranění chránící terc.butyloxykarbonylové skupiny bylo provedeno obdobným způsobem jako v příkladu 1h. Byl získán produkt ve výtěžku 57 % teorie, t. t. 165 až 170 °C.

Příklad 6

Hydrochlorid amidu tyrosyl-D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

- a) Methylester terc.butyloxykarbonyl-D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako odpovídající D-alaninový derivát uvedený v příkladu 4a ve výtěžku 77 % teorie, t. t. 106 až 112 °C.

- b) Amid terc.butyloxykarbonyl-D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako odpovídající D-alaninový derivát uvedený v příkladu 4b ve výtěžku 82 % teorie, t. t. 91 až 94 °C.

- c) Hydrochlorid amidu D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako odpovídající D-alaninový derivát uvedený v příkladu 4c ve výtěžku 59 % teorie, t. t. 114 až 118 °C.

- d) Amid terc.butyloxykarbonyltyrosyl-D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

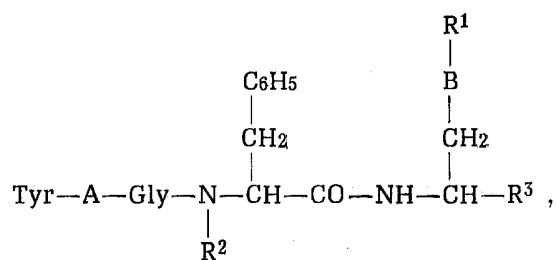
Byl připraven obdobným způsobem jako odpovídající D-alaninový derivát uvedený v příkladu 4d ve výtěžku 68 % teorie, t. t. 120 až 126 °C.

- e) Hydrochlorid amidu tyrosyl-D-leucyl-glycyl-fenylalanyl-S-ethylcysteinu

Byl připraven obdobným způsobem jako D-alaninový derivát uvedený v příkladu 4e ve výtěžku 65 % teorie, t. t. 182 až 187 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Deriváty pentapeptidů s účinkem podobným morfinu, obecného vzorce



ve kterém R^1 je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, R^2 je atom vodíku, R^3 je karboxyl nebo aminokarbonyl, A je zbytek glycinu, D-alaninu, D-methioninu nebo D-leucinu, B je atom síry nebo sulfoskupina.