PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-3214**
(22) Přihlášeno: **01.03.2000**
(30) Právo přednosti: **11.03.1999 DE 19991/9910727**
(40) Zveřejněno: **12.12.2001**
(Věstník č. 12/2001)
(47) Uděleno: **10.11.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.12.2008**
(Věstník č. 51/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2000/001751**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/053627**

(11) Číslo dokumentu:
299 879
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:
C07K 7/64 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 0770622; EP 0632053; EP 0578083.

(73) Majitel patentu:
MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE

(72) Původce:
Jonczyk Alfred, Darmstadt, DE
Arnold Markus, Neu-Isenburg, DE

(74) Zástupce:
JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název vynálezu:
Způsob přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) a lineární pentapeptidy, jako meziprodukty

(57) Anotace:
Způsob přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) cyklizací lineárního pentapeptidu voleného ze souboru sestávajícího z H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH a H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH, následným odstraněním chránicích skupin a popřípadě další konverzí na fyziologicky přijatelné soli. Lineární pentapeptidy jako meziprodukty pro jeho přípravu.

CZ 299879 B6

Způsob přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) a lineární pentapeptidy, jako meziprodukty

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) a lineárních pentapeptidů, jako meziproduktů pro tuto přípravu.

Dosavadní stav techniky

Cyklické pentapeptidy například také cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) a jejich fyziologicky přijatelné soli jsou popsány v patentovém spise číslo EP 0 770 622. Tento vynález je výběrovým vynálezem se zřetelem na EP 0 770 622.

Obecně se cyklické peptidy získávají cyklizací lineární prekurzorové molekuly za obvyklých podmínek syntézy peptidů. Aby mohla být zaručena selektivní vazba dvou aminokyselin nebo dvou segmentů sestávajících z několika aminokyselin, nebo alternativně cyklizace lineárního peptidu, je třeba blokovat vhodnými chránicími skupinami odpovídající funkční části aminokyselin, které se nemají na reakci podílet. Byly proto vyvinuty různé typy chránicích skupin pro aminoskupiny, pro skupiny karboxylové, hydroxylové, thiolové nebo karboxamidoskupiny a také pro guanidinové skupiny nebo pro imidazolový dusík, které ve svých kombinacích umožňují velkou možnost obměn se zřetelem na optimalizaci shora uvedených reakcí. Syntéza lineárních prekurzorových molekul, lineárních peptidu se může nadto provádět dvěma způsoby, jednak syntézou peptidu v pevné fázi, jednak v roztoku. V tomto případě jsou možné postupné kopulace aminokyselin nebo fragmentové kondenzace segmentů aminokyselin. Příslušné kopulační stupně se mohou opět provádět za pomoci různých kondenzačních činidel, jako jsou karbodiimidy, karbodiimidazol, sloučeniny uroniového typu, jako TBTU, nebo způsoby používajícími směsné anhydridy nebo aktivní estery.

Vynález je založen na vyvinutí nového zlepšeného způsobu přípravy cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) v porovnání s dosud známými způsoby.

S překvapením se zjistilo, že při syntéze cyklopeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) cyklizací lineární prekurzorové molekuly, kombinace chránicích skupin 2,2,4,6,7–pentamethyldihydrobenzofuran–5–sulfonylové (Pbf) pro guanidinoskupinu ve vedlejším řetězci argininu a benzylové (Bzl) pro karboxylovou skupinu ve vedlejším řetězci asparagové kyseliny vede k optimalizaci výtěžku.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob přípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal)

cyklizací lineárního pentapeptidu voleného ze souboru zahrnující ho

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH nebo
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH,

následným odstraněním chránicí skupiny a popřípadě další konverzí na fyziologicky přijatelné soli.

Vynález se dále tyká způsobu přípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal)

který spočívá v tom, že lineární pentapeptid H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH se cyklizuje.

Reakční podmínky této cyklizace lineárních pentapeptidů volených ze souboru zahrnujícího

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH nebo
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH,

s ohledem na volbu dehydratačního činidla, inertního rozpouštědla a reakční teploty a další převádění na jejich fyziologicky přijatelné soli jsou popsány v EP 0 770 622.

Benzylová chránicí skupina na vedlejším řetězci asparagové kyseliny může byt odstraněna za obvyklých podmínek (například T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, 2. vydání, vydavatel Wiley, New York 1991; nebo P.J. Kocienski, Protecting Groups 1. vydání, nakladatel George Thieme Verlag, Stuttgart–New York, 1994; H. Kunz, H. Waldmann, Comprehensive Organic Synthesis, sv. 6, (vydavatel B.M. Trost, I. Fleming, E. Winterfeldt), Pergamen, Oxford str. 631 až 701, 1991) například zpracováním vodíkem v přítomnosti katalyzátoru (například vzácného kovu, jako je palladium na uhlí). Vhodnými rozpouštědly jsou například ethanol nebo methanol nebo amidy jako dimethylformamid nebo směsi s dalšími inertními rozpouštědly, jako jsou například směsi s vodou. Hydrolýza se provádí zpravidla při teplotách přibližně 0 až 100 °C a tlacích přibližně 0,1 až 20 MPa, s výhodou 20 až 30 °C a 0,1 až 1 MPa.

Chránicí skupina Pbf, kterou zavedl do chemie peptidů L.A. Carpino a kol. (Tet. Let. 34, str. 7829–7832, 1993), se odstraňuje například 95% trifluoroctovou kyselinou (TFA). Chránicí skupina Pbf vykazuje v tomto případě větší labilitu se zřetelem na TFA než strukturálně podobné chránicí skupiny 4–methoxy–2,3,6–trimethylfenylsulfonylová (Mtr) a 2,2,5,7,8–pentamethylchroman–6–sulfonylová (Pmc), které jsou také možnými chránicími skupinami vedlejšího řetězce při přípravě cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal).

Trifluoroctové kyseliny se s výhodou používá v nadbytku bez přísady dalšího rozpouštědla. Trifluoroctová kyselina se může také použít jako směs s inertním rozpouštědlem, jako je například kombinace TFA/dichlormethan v poměru 6:4. TFA se může kromě toho použít také s přísadou 1 až 10 %, s výhodou 2 % vody. Reakční teplota pro odštěpení je výhodně přibližně 0 až 50 °C a reakce se s výhodou provádí při teplotě 15 až 30 °C (při teplotě místnosti).

Shora a dále uvedené zkratky aminokyselin mají následují–význam:

Asp	asparagová kyselina
Arg	arginin
Gly	glycin
Phe	fenylalanin
Val	valin

Kromě toho se ještě uvádějí zkratky, které mají následující vyznám:

BOC	terc–butoxykarbonyl
Bzl	benzyl

CHA	cyklohexylamin
D	charakterizace D–aminokyseliny
DCC1	dicyklohexylkarbodiimid
DMAP	dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
EDC1	N–ethyl–N,N´–(3–diroethylaminopropyl)karbodiimid, hydrochlorid
Et	ethyl
Fmoc	9–fluorenylmethoxykarbonyl
HOBt	1–hydroxybenzotriazol
Me	methyl
MTBE	methylterc–butylether
Mtr	4–methoxy–2,3,6–trimethylfenylsulfonyl
NMe	N–methylovaná α–aminoskupina
NMP	N–methylpyrrolidon
OtBu	terc–butylester
OMe	methyl ester
OEt	ethylester
Pbf	2,2,4,6,7–pentamethyldihydrobenzofuran–5–sulfonyl
Pmc	2,2,5,7,8–pentamethylchroman–6–sulfonyl
POA	fenoxyacetyl
Pr	propyl
Su	sukcinimid
TBTU	2–(1H–benzotriazol–1–yl)–1,1,3,3–tetra–methyluroniumtetrafluorborát
TFA	trifluoroctovou kyselinu
Z	benzyloxykarbonyl

Také se s překvapením zjistilo, že specifická volba chránicích skupin vedlejších řetězců Pbf na Arg a Bzl na Asp i při syntéze lineárních peptidů, které, jak bylo dříve zmíněno, jsou meziprodukty v syntéze cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal), vede ke zlepšeným výtěžkům v příslušných stupních syntézy. Výsledkem je, že výtěžek cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) je obecně zvýšen a z toho plyne snížení nákladů na syntézy.

Zlepšení výtěžku se dosahuje v tomto případě jak při syntéze peptidů v pevné fázi, tak v roztoku lineárních peptidů

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH nebo
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH,
zvláště H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH.

Chráněné aminokyseliny nebo fragmenty aminokyselin, používané v obou způsobech syntézy, se připravují obvykle způsoby syntézy aminokyselin a peptidů popsanými ve standardních publikacích (Principles of Peptide Synthesis, vydavatel M.Bodansky, Springer Verlag Berlin 1984; Houben Weyl, Methoden der organischen Chemie [Methods of Organic Chemistry], sv. 15/11, str.1 až 806 1974, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Calbiochem/Novablochem Catalogue and Synthesis Handbook 1999; Synthesis Notes or Peptide Synthesis Protocols, vydavatel M.W. Pennington a B.M. Dunn, Methods in Molecular Biology, sv 35, Humana Press Totowa N.J. 1994), a to za reakčních podmínek, které jsou pro jmenované reakce známy a vhodné. Přitom se může také používat o sobě známých, zde blíže nepopisovaných variant.

Základní principy syntézy peptidů v pevné fázi vypracovali B.F Gysin a R.B. Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 94, od str. 3102, 1972). Shora popsaná syntéza lineárních peptidů v pevné fázi, jejich izolace a čištění se provádí způsobem, který popsal A. Jonczyk a J. Meienhofer (Pepides, 8th Am.

Pept. Symp., vydavatel V. Hruby a G.H. Rich, Pierce Comp. III, str. 73 až 77, 1983) nebo obdobně způsoby popsanými v Angew. Chem. 104, str. 375 až 391, 1992.

Obzvlášť výhodně se lineární peptidy syntetizují, jak je shora popsáno, konvergentně fragmentovou kondenzací.

Vynález se proto dále tyká způsobu přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal), který spočívá v tom, že syntéza lineárního peptidu H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH se provádí konvergentně fragmentovou kondenzací tripeptidu R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH, kde znamená R^1 skupinu chránicí aminoskupinu s dipeptidem H–Arg(Pbf)–Gly–R^2, kde znamená R^2 skupinu chránicí karboxylovou skupinu a chránicí skupiny R^1 a R^2 se pak odstraní.

Symbol R^1 znamená skupinu chránicí aminoskupinu. Vyraz „skupina chránicí aminoskupinu" je obecně znám a jde o skupiny, které jsou vhodné k ochraně (k blokování) aminoskupiny před chemickými reakcemi, které jsou však snadno odstranitelné, když je žádoucí reakce na jiném místě molekuly provedena. Typické pro takové skupiny jsou zvláště nesubstituované nebo substituované skupiny acylové, arylové, aralkoxymethylové nebo aralkylové. Jelikož se skupiny, chránicí aminoskupinu, po žádoucí reakci (nebo po sledu reakcí) odstraňují, nemá jejich druh a velikost rozhodující vyznám. Výhodnými jsou však skupiny s 1 až 20 atomy uhlíku. Výraz „acylová skupina" je zde vždy míněn v nejširším slova smyslu. Zahrnuje acylové skupiny odvozené od alifatických, aralifatických, aromatických nebo heterocyklických karboxylových nebo sulfonových kyselin, jakož zvláště skupiny alkoxykarbonylové, alkenyloxykarbonylové, aryloxykarbonylové a především aralkoxykarbonylové. Jakožto příklady takových acylových skupin se uvádějí skupiny formylová nebo alkanoylové skupiny jako skupina acetylová, propionylová, butyrylová skupina; aralkanoylové jako fenylacetylová skupina; aroylové jako benzoylová nebo toluylová skupina; aryloxyalkanoylové jako fenoxyacetylová skupina; alkoxykarbonylové, jako skupina methoxykarbonylová, ethoxykarbonylová, 2,2,2–trichlorethoxykarbonylová, terc–butoxykarbonylová (BOC), 2–jodethoxykarbonylová; alkenyloxykarbonylové jako aryloxykarbonylová (Aloc); aralkyloxykarbonylové jako skupina benzyloxykarbonylová (CBZ, synonymum Z), 4–methoxybenzyloxykarbonylová (MOZ), 4–nitrobenzyloxykarbonylová nebo 9–fluorenylmethoxykarbonylová (FMOC), 2–(fenylsulfonyl)ethoxykarbonylová; trimethylsilylethoxykarbonylová skupina (Teoc); a arylsulfonylová skupina jako skupina 4–methoxy–2,3,6–trimethylfenylsulfonylová skupina (Mtr). Jakožto skupina chránicí aminoskupinu je dále známa tritylová skupina (Tri). Výhodnými skupinami, chránicími aminoskupinu, jsou skupiny BOC a Fmoc a Aloc, dále Z, benzylová a acetylová skupina. Zvláště výhodnou je skupina Boc.

Symbol R^2 znamená skupinu chránicí karboxylovou skupinu. Vyraz „skupina chránicí karboxylovou skupinu" je obecně znám a jde o skupiny, které jsou vhodné k ochraně hydroxylové skupiny karboxylové kyseliny před chemickými reakcemi. Typickými skupinami tohoto typu jsou shora uvedené nesubstituované nebo substituované skupiny arylové, aralkylové, aroylové nebo acylové, dále také skupiny alkylové, arylové a aralkylsilylové. Jelikož se skupiny, chránicí karboxylovou skupinu, po žádoucí reakci (nebo po sledu reakcí) odstraňují, nemá jejich druh a velikost rozhodující význam. Výhodnými jsou však skupiny s 1 až 20 a zvláště s 1 až 10 atomy uhlíku. Jakožto příklady skupin, chránicích hydroxylovou skupinu, se uvádějí skupiny aralkylové jako benzylová, 4–methoxybenzylová nebo 2,4–dimethoxybenzylová skupina; aroylové jako benzoylová nebo p–nitrobenzoylová skupina; acylové jako acetylová nebo pivaloylová skupina; p–toluensulfonylová skupina; alkylové jako methylová nebo terc–butylová skupina; avšak také allylová skupina; alkylsilylové jako trimethylsilylová (TMS), triizopropylsilylová (TIPS), terc–butyldimethylsilylová (TBS), triethylsilylová nebo trimethylsilylethylová skupina; nebo aralkylsilylové jako terc–butyldifenylsilylová (TBDPS) skupina. Výhodnými skupinami, chránicími karboxylovou skupinu, jsou skupina methylová, benzylová, acetylová, terc–butylová nebo TBS. Obzvláště výhodnou je skupina methylová a terc–butylová skupina.

Obecně výhodnými chránicími skupinami pro karboxylovou skupinu asparagové kyseliny jako vedlejšího řetězce jsou lineární nebo rozvětvené alkylové skupiny, jako skupina methylová, ethylová nebo terc–butylová, nebo aralalkylové skupiny, jako skupina benzylová. Při způsobu podle vynálezu je výhodnou skupina benzylová.

Obecně výhodnými chránicími skupinami pro guanidinoskupinu argininového vedlejšího řetězce jsou například skupina Z, Boc, Mtr nebo Pmc. Při způsobu podle vynálezu je výhodnou skupina Pbf.

Uvolňování chránicí skupiny použité v kterémkoliv případě je známé z literatury (například T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, druhé vydání, Wiley, New York, 1991; nebo P.J. Kocienski, Protective Groups, 1. vyd. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1994). Přitom se může také používat o sobě známých, zde blíže nepopisovaných variant.

Vynález se tyká shora popsaného způsobu, který spočívá v tom, že tripeptid R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH, kde znamená R^1 skupinu chránicí aminoskupinu, se připraví lineární syntézou reakcí Z–DPhe–OH s H–NMeVal–OMe na H–DPhe–NMeVal–OMe a pak jeho reakcí s aktivovaným derivátem R^1–Asp(OBzl)–OH a štěpením methylesteru.

Výhodným derivátem R^1–Asp(OBzl)–OH je sukeinimid R^1–Asp(OBzl)–OSu. Další aktivní estery, kterých je možno použít, jsou známy z obecné literatury o peptidech, uvedené shora.

Vynález se dále tyká shora popsaného způsobu, při kterém dipeptid H–Arg(Pbf)–Gly–R^2, kde znamená R^2 supinu chránicí karboxylovou skupinu, se připraví lineární syntézou reakcí Z–Arg(Pbf)–OH s H–Gly–R^2 a chránicí skupina Z se odstraní.

Podobně se vynález týká lineárních pentapeptidů, volených ze souboru zahrnujícího

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH nebo
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH,

jako meziproduktů pro syntézu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal).

Vynález se tyká způsobu přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal),

a) reakcí dipeptidu H–Arg(Pbf)–Gly–R^2, připraveného lineární syntézou Z–Arg(Pbf)–OH s H–Gly–R^2 a následným odstraněním chránicí skupiny Z,

b) s tripeptidem R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH, připraveným lineární syntézou Z–DPhe–OH s H–NMeVal–OMe a odstraněním chránicí skupiny Z za získání H–DPhe–NMeVal–OMe a následnou kopulací tohoto peptidu na aktivní ester R^1–Asp(OBzl)–OH a následným štěpením methyl esteru, konvergentně za získání lineárního pentapeptidu R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–R^2,

c) odstraněním chránicích skupin R^1 a R^2,

d) cyklizací uvolněného pentapeptidu H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH, za získání cyklo(Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal),

e) odstraněním benzylové chránicí skupiny,

f) odstraněním chránicí skupiny Pbf trifluoroctovou kyselinou a popřípadě převedením trifluoroacetátu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe—NMeVal), připraveného ve stupních a) až f) na další fyziologicky přijatelné soli.

Dalšími fyziologicky přijatelnými solemi jsou například soli anorganických kyselin, jako je kyselina sírová, siřičitá, dithionová, dusičná, hydrohalogenidové kyseliny, jako kyselina chlorovodíková nebo bromovodíková, fosforečné kyseliny, jako je kyselina ortofosforečná, sulfamová kyselina, dále organických kyselin, jako jsou obzvláště alifatické, alicyklické, aralifatické, aromatické nebo heterocyklické jednosytné nebo několikasytné karboxylové, sulfonové nebo sírové kyseliny, například kyselina mravenčí, octová, propionová, hexanová, oktanová, dekanova, hexadekanová, oktadekanová, pivalová, diethyloctová, malonová, jantarová, pimelová, fumarová, maleinová, mléčná, vinná, jablečná, citrónová, glukonová, askorbová, nikotinová, izonikotinová, methansulfonová nebo ethansulfonová, benzensulfonová, terimethoxybenzoová, adamantankarboxylová, p–toluensulfonová, glykolová, embonová, chlorofenoxyoctová, asparagová, glutamová, prolin, glyoxylová, palmitová, parachlorofenoxyizomáselná, cyklohexankarboxylová, glukózo–1–fosfát, naftalenmonosulfonová a disulfonová a laurylsírová kyselina.

Obzvlášť výhodnými fyziologicky přijatelnými solemi jsou hydrochlorid nebo interní soli cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal).

Jestliže znamená R^1 Boc a R^2 terc–butylovou skupinu, mohou byt tyto terc.–butylu podobné koncové chránicí skupiny štěpeny mravenčí kyselinou, bez napadení chránicích skupin Pbt a Bzl vedlejšího řetězce.

Další příklady popisují specifická provedení jednotlivých syntézních stupňů. Všechny teploty jsou ve °C.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza Boc–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH

1. Do roztoku 26,5 g Z–NMeVal–OH ve 200 ml methanolu se přikape 25,3 ml trimethylchlorsilanu a směs se míchá přes noc. Reakční směs se zbaví rozpouštědla a zbytek se vyjme do methylterc–butyletheru (MTBE) a promyje se 5% roztokem uhličitanu sodného a vodou. Po odstranění rozpouštědla se zbytek vyjme do methanolu a 1N kyseliny chlorovodíkové, smísí se s vodou navlhčeným 10% palladiem na uhlí a hydrogenuje se v mírném proudu vodíku. Po ukončení reakce se katalyzátor odfiltruje, filtrát se zbaví rozpouštědla a zbytek se překrystaluje z ethylacetátu. Získá se hydrochlorid H–NMeVal–OMe v 75% výtěžku.

2. Roztok 16,1 g Z–DPhe–OH, 10 g hydrochloridu H–NMeVal–OMe a 10,1 ml diisopropylethylaminu ve 100 ml dichlormethanu se ochladí na teplotu 0 až 5 °C a přidá se 11,35 g EDCI. Směs se napřed míchá jednu hodinu při teplotě 0 až 5 °C, pak přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní a zbytek se vyjme do MTBE a promyje se uhličitanem sodným (5% roztok), 1N kyselinou chlorovodíkovou a vodou a usuší se. Po odstranění rozpouštědla se získá Z–DPhe–NMeVal–OMe v 84,5% výtěžku.

3. Rozpustí se 12 g Z–DPhe–NMeVal–OMe v 80 ml THF a 20 ml vody, smísí se s 10 mg thymolftaleinu a přidává se 10M roztok hydroxidu sodného až do modrého zbarvení indikátoru. Po odbarvení indikátoru se směs opakovaně zpracuje přikapáním 10 M roztoku hydroxidu sodného. Pokud se už odbarvování indikátoru nepozoruje, nastaví se roztok na hodnotu pH 2 10% roztokem hydrogensíranu draselného, methanol se odstraní a produkt se extrahuje MTBE. Po vysušení síranem sodným se sůl CHA z filtrátu vysráží přidáním 2,9 ml CHA. Získá se Z–DPhe–NMeVal–OH x CHA v 90% výtěžku.

4. Míchá se 16,4 g Z–DPhe–NMeVal–OH x CHA (cyklohexylamoniové soli) ve 250 ml MTBE a 100 ml kyseliny fosforečné (10%) až do úplného rozpuštění. Po odstranění vodné fáze se

organická fáze promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší se. Rozpouštědlo se odstraní a zbytek se vyjme do 15,2 ml 2N roztoku hydroxidu sodného a 150 ml THF a po přidání většiny katalyzátoru (1 g 10% palladia na uhlí) se hydrogenuje v mírném proudu vodíku. Katalyzátor se odfiltruje a čirý roztok se zpracuje 12,1 g Boc–Asp(OBzl)–OSu a 4,5 ml triethylaminu a míchá se přes noc při teplotě místnosti. Po odstranění rozpouštědla se zbytek vyjme do MTBE a promyje se kyselinou fosforečnou (10%), vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organická fáze se zpracuje 3,3 ml CHA. Výsledná sůl Boc–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH x CHA se odfiltruje a vysuší se ve vakuu. Výtěžek je 93%.

Příklad 2

Syntéza H–Arg(Pbf)–Gly–OtBu

1. Míchá se 33,0 g Z–Arg(Pbf)–OH x CHA ve 300 ml octové kyseliny a 300 ml kyseliny fosforečné až do rozpuštění. Po odstranění vodné fáze se organická fáze promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší se. Rozpouštědlo se odstraní a zbytek se rozpustí ve 250 ml dichlormethanu s 8,38 g H–Gly–OtBu x HCl a ochladí se na teplotu 0 °C. Přidá se 17,12 ml diizopropylethylaminu a 16,05 g TBTU a směs se míchá 60 minut při teplotě 0 °C a přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní a nahradí se 250 ml ethylacetátu. Po promytí roztokem uhličitanu sodného (5%), vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného se rozpouštědlo odstraní. Získá se Z–Arg(Pbf)–Gly–OtBu v 86% výtěžku.

2. Roztok 30 g Z–Arg(Pbf)–Gly–OtBu ve 350 ml THF se smísí se 3 g vodou navlhčeného 10% palladia na uhlí a Z–skupina se odstraní hydrogenací mírným proudem vodíku. Katalyzátor se odfiltruje a rozpouštědlo se odstraní. Zbytek se vyjme do ethylacetátu a zpracuje se dále jako v příkladu 2.1. Získá se H–Arg(Pbf)–Gly–OtBu v 86% výtěžku.

Příklad 3

Syntéza H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH

1. Převede se 1,23 g Boc–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH x CHA obvyklým způsobem na volnou kyselinu, která se rozpustí ve 12,5 ml dichlormethanu s 0,81 g H–Arg(Pbf)–Gly–OtBu a 0,22 g DMAP. Roztok se ochladí na 0 až 5 °C a zpracuje se 0,345 g EDCI. Míchá se dvě hodiny při teplotě 0 až 5 °C a přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní, zbytek vyjme do MTBE a zpracuje se dále jako v příkladu 2.1. Získá se Boc–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OtBu v 82% výtěžku.

2. Rozpustí se 2,3 g Boc–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OtBu ve 23 ml 95% mravenčí kyseliny k odstranění koncových chránicích skupin a zkoncentruje se ve vakuu v průběhu 30 minut. Produkt se tritruje s etherem, odfiltruje se a vysuší se ve vakuu. Získá se H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH x HCOOH v 95% výtěžku.

Příklad 4

Syntéza cyklo(Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal)

Roztok 11,9 g H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH x HCOOH v 60 ml MNMP se přikape do míchaného roztoku 7,25 g TBTU a 7,45 ml N–methylmorfolinu ve 180 ml N–methylpyrrolidonu. Reakční roztok se míchá 20 hodin, načež se přikape do roztoku 47,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve 1800 ml vody. Sraženina se odfiltruje a vysuší se ve vakuu. Získá se cyklo(Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal) v 73,4% výtěžku.

Příklad 5

Syntéza cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal)

1. Roztok 2 g cyklo(Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal) ve 26 ml THF se smísí s 0,5 g 10% palladia na uhlí. Nechá se probublávat dvě hodiny vodík, směs se zbaví katalyzátoru a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Produkt vykrystaluje po přidání 32 ml acetonu, odfiltruje se a vysuší. Získá se cyklo–(Arg(Pbf)–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) v 83% výtěžku.

2. Rozpustí se 1,5 g cyklo(Arg(Pbf)–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) v 15 ml 95% TFA. Po jedné hodině se roztok přikape do 150 ml izopropyletheru a pevná látka se odfiltruje a vysuší. Vysušený produkt se rozpustí ve 30 ml směsi izopropanol/voda 1:2 a zpracuje se iontoměničem III (acetátová forma; Merck KGaA). Zfiltrovaný roztok se zkoncentruje a vysuší se vymrazováním. Získá se cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) v podobě vnitřní soli v 96% výtěžku.

Průmyslová využitelnost

Způsob přípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal) v daleko větším výtěžku než dosud známými způsoby.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal)

vyznačující se tím, že se cyklizuje lineární pentapeptid zvolený ze souboru sestávajícího z

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH a
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH,

poté se odstraní chránicí skupiny a výsledný produkt se popřípadě převede na fyziologicky přijatelnou sůl.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se cyklizuje pentapetid H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se syntéza lineárního peptidu H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH provádí konvergentně fragmentovou kondenzací tripeptidu R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH, kde znamená R^1 skupinu chránicí aminoskupinu, s dipeptidem H–Arg(Pbf)–Gly–R^2, kde znamená R^2 skupinu chránicí karboxylovou skupinu a chránicí skupiny R^1 a R^2 se odstraní.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že tripeptid R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH, kde R^1 znamená skupinu chránicí aminoskupinu, se připravuje lineární syntézou reakcí Z–DPhe–OH s H–NMeVal–OMe za vzniku H–DPhe–NMeVal–OMe, po níž následuje reakce H–DPhe–NMeVal–OMe s aktivovaným derivátem R^1–Asp(OBzl)–OH za vzniku

R^1–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OMe a poté štěpení methylesteru v posledně uvedené sloučenině.

5. Způsob podle nároku 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že dipeptid H–Arg(Pbf)–Gly–R^2, kde R^2 znamená skupinu chránicí karboxylovou skupinu, se připraví lineární syntézou reakcí Z–Arg(Pbf)–OH s H–Gly–R^2 a odstraněním chránicí skupiny Z.

6. Lineární pentapeptidy zvolené ze souboru sestávajícího z

H–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–OH,
H–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–OH,
H–Asp(OBzl)–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–OH,
H–DPhe–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–OH a
H–NMeVal–Arg(Pbf)–Gly–Asp(OBzl)–DPhe–OH

jako meziprodukty pro syntézu cyklo(Arg–Gly–Asp–DPhe–NMeVal).

Konec dokumentu