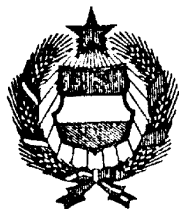


(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)
185022

B
Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₃

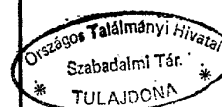
C 07 C 103/52

A bejelentés napja: (22) 1980. XII. 16. (21) 3012/80

A bejelentés elsőbbsége: (33) US
(32) 1979. XII. 12.
(31) 1104,529

A közzététel napja: (41) (42) 1983. XII. 28.

Megjelent: (45) 1989. 02. 06.



Feltaláló(k): (72)

Gesellchen Paul David, biokémikus, Indianapolis, Shuman
Robert Theodore, biokémikus, Greenwood, US

Szabadalmaz: (73)

Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, US

(54)

Eljárás biológiailag aktív tetrapeptid-származékok előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az I általános képletű, ahol

R₁ jelentése hidrogénatom vagy 1–3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport,

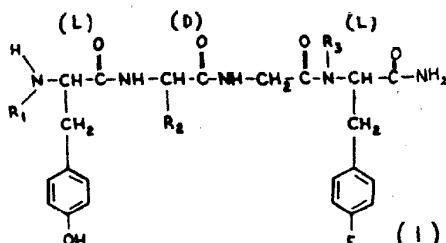
R₂ jelentése 1–4 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport vagy 1–2 szénatomot tartalmazó hidroxil-alkil-csoport,

R₃ jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomot tartalmazó, primer vagy szekunder alkilcsoport, és

L és D az illető szénatom konfigurációját jelölik, tetrapeptid-származékok acetátjainak előállítására.

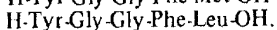
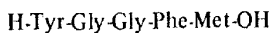
A találmány szerinti I általános képletű vegyületeket megfelelően helyettesített kiindulási anyagok felhasználásával, a peptidkémiai szokásos módszerekkel állítják elő.

A találmány szerinti I általános képletű vegyületek értékes fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek.



A találmány tárgya eljárás egy új, fájdalomcsillapító hatást mutató tetrapeptid-származékok előállítására.

A közelmúltban emlősök agyából és agy-gerincvelői folyadékából merfinszerű tulajdonságokkal rendelkező endogén anyagokat vontak ki. E vegyületeket enkefalinoknak nevezik, szerkezetüket Hughes és munkatársai (Nature 258, 577 /1975/) derítették fel, eszerint az enkefalinok az alábbi összetételű penta-peptidek:



E két vegyületet metionin-enkefalinnak, illetve leucin-enkefalinnak nevezik.

Habár kimutatták, hogy a metionin-enkefalin és a leucin-enkefalin fájdalomcsillapító hatást mutat, ha egerek agykamrájába adjuk be őket (Buscher és munkatársai, Nature 261, 423 /1976/), gyakorlatilag mégis használhatatlanok, mivel parenterálisan (a gyomor- és bélrendszer megkerülésével) adagolva nincs fájdalomcsillapító hatásuk.

Ezért az enkefalinok felfedezése óta sok új enkefalin-analógot állítottak elő, abban a reményben, hogy hatásuk nagyobb lesz és, hogy parenterális vagy orális (szájon át) adagolás esetén biológiai hozzáférhetőségük (bioavailability) révén gyakorlatban is alkalmazhatóak lesznek.

Dutta és munkatársai, Life Sciences 21, 559-562 (1977) leírtak bizonyos szerkezeti változtatásokat, amelyek szerintük megerősítik az új származékok biológiai hatását. Szerintük az enkefalin-származékok hatását az alábbi szerkezeti változtatások egyikének vagy összességének bevezetésével lehet felerősíteni:

- a) A 2-es helyen lévő glicin helyettesítése bizonyos D- vagy α -a-aminosavakkal,
- b) a terminális karboxilcsoport átalakítása metil-észterre vagy amiddá,
- c) a 4-es helyzetben lévő fenil-alanin módosítása α -a helyettesítéssel, N-metilezéssel vagy az aromás gyűrű hidrogénezésével.

Ezenkívül Roemer és munkatársai, Nature 268, 547-549 (1977) azt javasolják, hogy az 5-ös helyzetben lévő metionint a megfelelő karbinollá kell átalakítani, és a metioninban szereplő kénatomot S-oxidá (szulfoxiddá) kell oxidálni.

Egy további jelentős szerkezeti változtatást ismertet a 859.026. számú belga szabadalmi leírás, Eszerint az enkefalin-származékok hatását és biológiai hozzáférhetőségét azzal lehet megnövelni, ha a 2-es helyzetbe egy D aminosavat iktatnak be, a terminális karboxilcsoportot amiddá alakítják és az 5-ös helyzetben lévő aminosavat N-alkilezik.

Felfedeztük az enkefalin-analógoknak egy olyan családját, amely erős fájdalomcsillapító hatást mutat. Ezek a halogénezett tetrapeptidek, amelyek nagymértékben specifikusak mind a halogénatom anyagi minőségét, mind pedig a halogénatom helyzetét tekintve. Az alábbi I általános képletű vegyületek olyan tetrapeptidek, ahol a peptid 4-es helyzetében p-fluor-helyettesített L-fenil-alanin szerepel.

Az irodalom ismertet más, halogénezett 4-fenil-alanil-enkefalin-analógokat is, ezek azonban nem tetrapeptidek, és nem is p-fluor-helyettesített 4-fenil-alanil-enkefalin-analógok. A. R. Day és munkatársai (Res. Comm. in Chem. Path. and Pharmacol. 14 (4), 597-603 /1976/) leírja a H-Tyr-Gly-Gly-pCIPhe-Nle-

OH-t. R. J. Miller és munkatársai (Vitamins and Hormones 36, 297-382, Academic Press /1978/) megemlíti az alábbi vegyületeket: H-Tyr-D-Ala-Gly-pCIPhe-D-Leu-OH, H-Tyr-D-Ala-Gly-pCIPhe-D-Leu-OMe és H-Tyr-D-Ala-Gly-pCIPhe-D-Leu-NH₂. Pless és munkatársai a 15. Európai Peptidszimposiumon tartott előadásukban (1978. szeptember 4-9., Gdansk, Lengyelország) beszámoltak a H-Tyr-D-Ala-Gly-pCIPhe-Met(O)-OH összetételű vegyületükről. D. H. Coy és munkatársai (BBRC 83 (3), 977-983 /1978/) említik a H-Tyr-D-Ala-Gly-F₅Phe-Met-NH₂-t.

A fenti közlemények egyike sem ír le az alábbi I általános képletű vegyületek körébe tartozó származékokat, azt találtuk, hogy az enkefalin-analógok fájdalomcsillapító hatása tekintetében a halogénatomnak mind az anyagi minősége, mind pedig a helyzete döntő jelentőségű.

A találmány tárgya eljárás az I általános képletű, ahol

R₁ jelentése hidrogénatom vagy 1-3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport,

R₂ jelentése etilcsoport vagy 1-hidroxi-etil-csoport

R₃ jelentése 1-4 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport, és

L és D az illető szénatom konfigurációját jelölik, tetrapeptid-származékok acetátjainak előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, a peptidkémiai szokásos módon védett I általános képletű, ahol R₁, R₂ és a fenti vegyületről a védőcsoportot (vagy védőcsoportokat) szokásos módon lehasítjuk, majd a terméket ecetsavval kezeljük.

Az I általános képletű vegyületekben lévő aszimmetriacentrumok konfigurációja e vegyületek igen lényeges vonása. Kényelmi okokból az I általános képletű penta-peptidekben szereplő aminosav-egységek a terminális aminocsoporttól kezdve megszámozzuk. Az egyes aminosav-egységek aszimmetriacentrumának konfigurációja az 1-es helytől a 4-es helyzet felé haladva: L, D, — és L. A 3-as helyzetben glicin szerepel, és ezért ezen egységek esetében nem beszélhetünk aszimmetriacentrumról.

Az R₁ jelentése a fentiek szerint lehet 1-3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport is. Az 1-3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport lehet metil-, etil- vagy n-propilcsoport.

Az R₃ jelentése a fenti meghatározás szerint lehet 1-4 szénatomot tartalmazó, primer illetve szekunder alkilcsoport. Az 1-4 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport lehet metil-, etil-, n-propil-, n-butil-, butilcsoport.

Az I általános képletű tetrapeptidekben szereplő egyes aminosav-egységek tekintetében a következő szempontok érvényesülnek:

A/1-es hely

Ez a peptid N-terminális része. Ezt az egységet az L-tirozinból származtatjuk el. Ezen egység aminocsoportja lehet helyettesítetlen, ekkor R₁ jelentése hidrogénatom. Ezenkívül ezen aminosav-egység aminocsoportja viselhet egy 1-3 szénatomot tartalmazó, primer alkil-helyettesítőt, tehát lehet N-metil-, N-etil- vagy N-n-propil-származék. Ahhoz, hogy parenterális adagolás mellett rendkívül erős fájdalomcsillapító hatású vegyületeket kapjunk, az 1-es helyzetben lévő tirozilcsoportnak előnyösen az aminocsoportján helyettesítetlennek kell lennie. Ahhoz, hogy orális adagolás mellett rendkívül erős fájdalomcsillapító hatású ve-

gyületeket kapjunk, az 1-es helyzetben lévő tirozil-csoport aminosocsoportjának előnyösen helyettesítettnek kell lennie. E helyettesítő előnyösen metilcsoport B/2-es hely

Az I általános képletű peptidek 2-es helyzetében lévő aminosav aszimmetria-centrumának D-konfigurációjának kell lennie, ezen a helyen több aminosav is szerepelhet. Ilyenek a D-alanin (Ala) (R_2 jelentése metilcsoport), D-norleucin (Nle) (R_2 jelentése n-butilcsoport), D-treonin (Thr) (R_2 jelentése 1-hidroxi-etilcsoport). A peptid 2-es helyzetében előnyösen D-alanin van.

C/3-as helyzet

A peptid ezen helyzetében glicin (Gly) áll.

D/4-es helyzet

A peptid 4-es helyzetében para-helyzetben fluoratommal helyettesített L-fenil-alanin (Phe/F) áll. Ezen aminosav-egység aminosocsoportja lehet helyettesítetlen vagy helyettesített (R_3). Abban az esetben, ha az ezen a helyen szereplő aminosav-egység aminosocsoportja helyettesített, akkor a helyettesítő lehet metil-, etil-, propil-, izopropil-, n-butil-, izobutil-, szekunder-butil-csoport. Ezen aminosocsoport előnyösen helyettesített, vagy R_3 jelentése hidrogénatomtól eltérő. R_3 jelentése előnyösen 1–4 szénatomot tartalmazó, primer vagy szekunder alkilcsoport. R_3 jelentése legelőnyösebben metil-, etil-csoport.

Az I általános képletű vegyületek C-terminális helyzetében lévő csoport valamely aminosavból le származtatható amid ($-CO-NH_2$).

Az I általános képletű vegyületeket a peptidszintézis szokásos módszereivel állítjuk elő. Egyes I általános képletű vegyületek előállításánál során részleges racemizáció következhet be. Ha ilyen racemizáció be is következik, ez sohasem olyan mértékű, hogy az I általános képletű vegyületek fájdalomcsillapító hatása ezáltal szignifikánsan megváltozzék.

Az I általános képletű vegyületeket előállíthatjuk szilárd fázisú, vagy klasszikus, oldatban lefolytatott peptidszintézis útján. Ha a szilárd fázisú módszert követjük, akkor a peptidláncot valamely gyanta hordozón fokozatosan építjük ki, általában valamely benzil-amin típusú gyantán, vagy klórmetilézett polisztirol-gyantán. Végül a terméket hidrogén-fluoriddal körülbelül 0 °C hőmérsékleten hasítjuk le a gyantáról, és általában kromatográfiás úton tisztítjuk.

Bármelyik módszert is követjük, az I általános képletű vegyületek előállítása abban áll, hogy aminosavakat, vagy peptidfragmenseket reagáltatunk egymással oly módon, hogy az egyik aminosav vagy peptidfrágmen aminosocsoportját a másik aminosav vagy peptidfrágmen karboxilcsoportját a másik aminosav vagy peptidfrágmen aminosocsoportjával reagáltatjuk, s így amidkötést hozunk létre. A hatékony kapcsolás érdekében kívánatos, hogy egyrészt a reakcióban közvetlenül részt nem vevő valamennyi reakcióképes csoport megfelelő védőcsoportok segítségével inaktíváljuk, másrészt pedig, hogy a kapcsolni kívánt karboxilcsoportot a kapcsoláshoz megfelelő módon aktiváljuk. Ennek érdekében gondosan kell meghatározni mind az egymást követő reakciók sorrendjét és reakciókörülményeit, továbbá megfelelő védőcsoportokat kell alkalmaznunk ahhoz, hogy a kívánt peptidet elő tudjuk állítani. Az I általános képletű vegyületek előállítása során felhasznált valamennyi aminosavat, amely a szükséges védőcsoportokat és aktiváló csoport

tokat tartalmazza, a peptidszintézisben szokásos, ismert módszerekkel állítjuk elő.

Az I általános képletű vegyületek totálszintézisének minden egyes lépéséhez a védőcsoportok meghatározott kombinációját alkalmazzuk. Azt találtuk, hogy a szintézist ezen kombinációk alkalmazásával lehet a legkönnyebben végrehajtani. Alkalmazhatnánk az I általános képletű vegyületek szintézise során más kombinációkat is, azonban feltehetőleg kevesebb sikerrel. Így például az I általános képletű vegyületek szintézise során amin-védőcsoportként használhatunk például benziloxi-karbonil-, tercier-butoxikarbonil-, tercier-amiloxikarbonil-, p-metoxi-benziloxi-karbonil-, adamantiloxi-karbonil- és izoborniloxi-karbonil-csoportot, továbbá a tirozin hidroxilcsoportjának védésére általában benzilcsoportot (Bzl) alkalmazunk, bár jó eredménnyel alkalmazhatunk más csoportokat is, például p-nitro-benzil-(PNB), p-metoxi-benzilcsoportot (PMB) és más hasonló csoportokat.

Az I általános képletű vegyületek előállítása során a karboxilcsoportok védésére használhatunk bármilyen tipikus észterképző csoportot, így például metil-, etil-, benzil-, p-nitrobenzil-, p-metoxibenzil-, 2,2,2-triklór-etil-csoportot és más hasonló csoportokat.

Az I általános képletű vegyületek előállítása során valamely, az aminosocsoportján (vagy aminosocsoportjain) megfelelően védett aminosavat vagy peptidfrágmenst úgy kapcsolunk össze valamely, a karboxilcsoportján védett aminosavval vagy peptidfrágmen-sel, hogy az aminosocsoportján (vagy aminosocsoportjain) védett aminosav vagy peptidfrágmen szabad karboxilcsoportját aktiváljuk. Ezt végrehajthatjuk többféle ismert módszer bármelyikével. Az egyik ilyen aktiválási módszer során a karboxilcsoportot vegyes anhidriddé alakítjuk. E célból a szabad karboxilcsoportot valamely más sav, általában a szénsav valamely származékával, például savkloridjával reagáltatjuk. A vegyes anhidridek előállításához savkloridként használhatunk például klórhangyasav-etil-észtert, klórhangyasav-fenil-észtert, klórhangyasav-szekunder-butil-észtert, klórhangyasav-izobutil-észtert, pivaloil-kloridot vagy más hasonlókat. Előnyösen klórhangyasav-izobutil-észtert alkalmazhatunk.

Egy másik módszer szerint a kapcsolási reakcióhoz úgy aktiváljuk a karboxilcsoportot, hogy valamely aktív észterre alakítjuk. Ilyen aktív észterek például a 2,4,5-triklór-fenil-észter, a pentaklór-fenil-észter, a p-nitro-fenil-észter és más hasonló észterek. Egy további alkalmazható kapcsolási módszer a jól ismert azidos kapcsolási módszer.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kivitelezési változata szerint az I általános képletű vegyületek előállítása során a szabad karboxilcsoportokat N,N'-diciklohexil-karbo-diimiddal (DCC) aktiváljuk a kapcsoláshoz. Ezt az aktiválást és kapcsolást úgy végezzük, hogy a kapcsolni kívánt aminosav vagy peptidfrágmen mennyiségével molárisan azonos mennyiségű DCC-t használunk, és az átalakítást 1-hidroxi-benzotriazol (HBT) molárisan azonos mennyiségének jelenlétében végezzük. Az 1-hidroxi-benzotriazol segítségével visszaszoríthatjuk a nem-kívántatos mellékreakciókat, így a racemizációt is.

Az I általános képletű vegyületek előállításának bizonyos fázisaiban le kell hasítanunk a védőcsoportokat. Egy átlagosan képzett peptidkémikus könnyen ki tudja választani a védőcsoportok közül azon csoport

tokat, amelyek egymással összeférhetők olyan értelemben, hogy az adott aminosavon vagy peptidfragmensén lévő egy vagy több védőcsoportot (de nem az összeset) szelektíven le lehessen hasítani. Ezek a módszerek a peptidkémiaiban jól ismertek. A védőcsoportok szelektív lehasításának módszereit az irodalom részletesen ismerteti, lásd például Schröder és Lübke, *The Peptide (A peptidek)*, I. kötet, Academic Press, New York (1965), és különösen az idézett mű 72-75. oldalán található táblázat.

A karboxil-védőcsoportokat lúgos hidrolízis útján hasíthatjuk le. A védett karboxilcsoportok szabadbázisra való viszonylag erősen lúgos reagenseket használunk, általában valamely alkálifém hidroxidját, például nátrium-hidroxidot, kálium-hidroxidot, lítium-hidroxidot és más hasonlókat. E hidrolízis körülményei a szakemberek által jól ismertek. Számos karboxil-védőcsoportot katalitikus hidrogenolízis útján is lehasíthatunk, például csontszenes palládium katalizátor jelenlétében. Ezenkívül, ha a karboxil-védőcsoport p-nitrobenzil- vagy 2,2,2-triklór-etil-csoport, akkor e csoportokat cinkkel és sósavval végzett redukció útján is lehasíthatjuk.

Az amin-védőcsoportok közül sokat lehasíthatunk úgy, hogy a védett aminosavat vagy peptidet valamely savval, például hangyasavval, trifluoecetsavval (TFA), p-toluol-szulfonsavval (TSA), benzol-szulfonsavval (BSA), naftalin-szulfonsavval vagy más hasonlókkal kezeljük, és ilyenkor a termék megfelelő savaddíciós sója keletkezik. Más védőcsoportokat, például a benziloxi-karbonilcsoportot lehasíthatjuk oly módon, hogy a védett aminosavat vagy peptidet hidrogénbromid és ecetsav elegyével kezeljük, ekkor a megfelelő hidrobromid keletkezik. Egy adott védett aminosav vagy peptidfragmens védőcsoportjainak eltávolítására kiválasztott módszer az adott vegyület kémiai és fizikai sajátosságaitól függ. A reakcióban keletkező savaddíciós só át alakíthatjuk valamely, gyógyászati lag elfogadható sóvá oly módon, hogy a sót valamely alkalmas ioncserélő gyantával kezeljük, például DEAE Sephadex A25-tel, Amberlyst A27-tel és más hasonlókkal.

A hidroxil-védőcsoportot a termék előállítása során végig megtarthatjuk, és a szintézis utolsó lépésében, az amin-védőcsoportokkal együtt hasíthatjuk le, a karboxil-védőcsoport lehasítása során alkalmazott reakciókörülmények függvényében azonban korábban is lehasíthatjuk. Ha a karboxil-védőcsoportot lúgos hidrolízis útján hasítjuk le, akkor a hidroxil-védőcsoport rajta marad a molekulán, ha azonban a karboxil-védőcsoportot katalitikus hidrogenolízis útján távolítjuk el, akkor a hidroxil-védőcsoport is lehasad. Ez azonban nem okoz problémát, mivel az I általános képletű vegyületeket előállíthatjuk szabad hidroxil-csoportot viselő tirozilcsoport jelenlétében is.

Az I általános képletű tetrapeptidek előállítását az A-reakcióvázzal szemléltetjük. A reakcióvázzalban a Z jelentése a C-terminális csoport-, mégpedig akár végső formájában, akár e csoport prekursorának formájában, az AA jelentése az adott aminosav-egység, és ezen AA jelölés alsó indexeként megadott szám az illető aminosav-egységnek a peptid végtermékben elfoglalt helyzetét jelöli.

Az A-reakcióvázzal az I általános képletű vegyületek előállításának egyik lehetőségét szemlélteti. Az I általános képletű vegyületeket más úton is előállít-

hatjuk. Így például alkalmazhatjuk azt a módszert, amelynek során a reakciókat szintén oldatban végezzük el, és a peptidláncot úgy építjük ki, hogy a C-terminális aminosavból kiindulva és az egyes aminosavakat egyenként rákapcsolva építjük ki a kívánt pentapeptideket. Akár a fentiekben ismertetett, akár valamely más reakciósorozatot alkalmazunk, az egyes reakciókat a fentiekben ismertetett módszerekkel hajtjuk végre.

Egyes I általános képletű vegyületekben R_1 és R_2 jelentése lehet alkáli-, csoport lehet. Ezen vegyületek előállítása során a megfelelő N-helyettesített aminosavakat alkalmazzuk. Az aminosocsoportjukon védett aminosavakból, mint kiindulási anyagokból a B-reakcióvázzal szemléltetett módon állítjuk elő. Amint ezt a B-reakcióvázzal szemlélteti, az aminosavat először kálium-hidriddel kezeljük, valamely alkalmas koronaéter jelenlétében, és így a megfelelő dianion (két-szeres negatív töltésű ion) keletkezik. Ezután ezt a dianiont kezeljük a megfelelő alkil-joddal, és így a kívánt N-helyettesített aminosavhoz jutunk.

Egy átlagosan képzett peptidkémikus előtt nyilvánvaló, hogy erősen lúgos körülmények között, például a fent ismertetett alkilezés körülményei között az α -szénatomon racemizáció játszódhat le. A racemizáció mértéke az adott aminosavtól függ. A racemizáció mértékét minimálisra szoríthatjuk vissza oly módon, hogy az alkilezőszert főlegesen alkalmazzuk, és a reakciót a lehető legrövidebb idő alatt végezzük el. Ha azonban nem-kívánatos mértékű racemizáció következik be, akkor a terméket úgy tisztíthatjuk meg, hogy valamely alkalmas királis aminnal, például d(-)- α -fenil-etil-aminnal képzett sóját átkristályosítsuk.

Az I általános képletű vegyületek értékes gyógyászati hatással rendelkeznek. E vegyületeknek fájdalomcsillapító és neuroleptikus hatásuk van. Emlősöknek, beleértve az embert is, parenterálisan vagy orálisan adagolva különösen alkalmasak a fájdalom enyhítésére és érzelmi zavarok kiküszöbölésére.

Az I általános képletű vegyületeket adagolhatjuk önmagukban, vagy gyógyászati lag elfogadható vivőanyagokkal együtt, amely vivőanyagok mennyisége az adott vegyület oldhatóságától és kémiai természetétől az adagolás módjától és a szokásos gyógyszerészeti gyakorlattól függ.

Előnyösek a parenterálisan adagolható gyógyászati készítmények, vagyis az izomba (intramuszkuláris), bőr alá (szubkután) vagy vénába (intravénás) adható készítmények. Ilyenek a steril, injektálható oldatok vagy szuszpenziók, és a steril, injektálható depot-(lassan felszívódó) készítmények. Különösen kényelmesen alkalmazhatók az izotóniás (a vérrel azonos ozmózisnyomású) konyhasó-oldattal, vagy izotóniás dextróz-oldattal készült steril injektálható oldatok. A steril injektálható készítményeket elkészíthetjük előre, és tárolhatjuk őket kész állapotban, vagy pedig elkészíthetjük őket közvetlenül a felhasználás előtt oly módon, hogy valamely steril közeget – például vizet – adunk valamely, egy flakóban vagy ampullában lévő, ismert mennyiségű steril hatóanyaghoz. Ez esetben a flakó vagy ampulla sterilen tartja a készítményt. A steril hatóanyag mellett jelen lehet olyan mennyiségű steril dectróz vagy nátrium-klorid, amely biztosítja, hogy a steril közeg hozzáadása után az oldat vagy szuszpenzió a vérrel izotóniás legyen.

Előnyösen az orálisan adagolható készítmények is. Ezek lehetnek például kapszulák, tabletták és más hasonló gyógyszerformák, amelyekben a hatóanyag meghatározott mennyisége van jelen. Alkalmas orális készítmények még például a porok, granulátumok, valamely vizes vagy nem vizes közeggel készült oldatok, szuszpenziók vagy emulziók.

A tablettákat préselés útján állíthatjuk elő, általában egy vagy több segédanyag felhasználásával. A tablettákat úgy készítjük el, hogy a hatóanyagot por vagy granulátum formájában általában összekeverjük egy vagy több segédanyaggal, például kötőanyagokkal csúsztatószerkezzel, semleges hígítószerkezzel, felület-aktív anyagokkal, pufferoló anyagokkal, ízesítő anyagokkal, sűrítőszerkezzel, konzerválószerkezzel, diszpergálószerkezzel vagy más hasonlókkal, és ezt a keveréket préseljük.

Az I általános képletű vegyületek pontos dózisát a kezelőorvos állapítja meg. A kiválasztott dózis az adagolás módjától, az adott hatóanyagtól, a kezelt beteg-től és a kezelés módjától függ. Általában azonban, ha a hatóanyagot intramuszkulárisan vagy szubkután adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 0,5 µg és körülbelül 2 mg között van, és előnyösen körülbelül 10 µg és körülbelül 100 µg között. Ha viszont a hatóanyagot intravénásan adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 0,1 µg és körülbelül 200 µg között van, és előnyösen körülbelül 1 µg és körülbelül 50 µg között. Ha a hatóanyagot orálisan adagoljuk, akkor a dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 100 µg és körülbelül 100 mg között, és előnyösen körülbelül 500 µg és körülbelül 50 mg között van. Még előnyösebben az orális dózis testsúly-kilogrammonként körülbelül 1 µg és körülbelül 10 µg között van.

A találmány szerinti eljárást a továbbiakban, a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül, példákkal szemléltetjük.

1. példa

L-Tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid, ecetsavas só

a) lépés

N^α-Trifluor-acetil-D,L-p-fluor-fenil-alanin

100 ml trifluor-ecetsavhoz hozzáadunk 25 g (0,137 mól) D,L-p-fluor-fenil-alanint. Az elegyet 0 °C hőmérsékletre hűtjük, majd 5 perc alatt hozzáadagolunk 21 ml (0,149 mól) trifluor-ecetsav-anhidridet. Az elegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradékot 100 ml vízzel hígítjuk, a kivált csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. Ily módon 30,1 g (hozam: 79%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 140–143 °C.

Analízis a C₁₁H₉NO₃F₄ (279,2) képlet alapján, számított: C: 47,32%, N: 3,25%, F: 5,02%, talált: C: 47,03%, H: 3,41%, N: 5,16%.

b) lépés

L-p-Fluor-fenil-alanin

500 ml vízhez hozzáadunk 28 g (0,1 mól), az a) lépésben leírt módon nyert terméket. Az elegyhez keverés közben annyi 2 n nátrium-hidroxid-oldatot adunk, hogy pH=7,2-nél tiszta oldatot kapjunk. Az oldathoz hozzáadunk 35 mg karboxipeptidáz A enzimet, és az elegyet 5 napon át lassú keverés mellett 37 °C hőmérsékleten, pH=7,2 értéken tartjuk. Utána az oldat pH-ját 5,0-ra állítjuk, szenezzük és megszáritjuk.

A szűrlet pH-ját 1 n sósavval 3,0-ra állítjuk, és etil-acetáttal háromszor kirázzuk. Ezután a vizes oldat pH-ját 2 n nátrium-hidroxid-oldattal 7,0-ra állítjuk, és csökkentett nyomáson addig töményítjük, míg az L-izomer el nem kezd kristályosodni. Utána a csapadékot oldatot hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni, a csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk, így módon 8,8 g (hozam: 96%) cím szerinti vegyületet kapunk.

[α]_D²⁵ = -2,75° (c = 0,51 1 n HCl).

c) lépés

N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-p-fluor-fenil-alanin

25 ml terciér-butyl-alkohol, 5 ml víz és 20 ml 2 n nátrium-hidroxid-oldat (0,04 mól) elegyéhez hozzáadunk 7,32 g (0,04 mól), a b) lépésben leírt módon előállított terméket. Ezután az elegyhez hozzáadunk 8,9 g (0,041 mól) di-tercier-butyl-karbonátot, és a reakcióelegyet 4 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután hozzáadunk 50 ml vizet, és dietil-éterrel kirázzuk. A vizes részt leválasztjuk, hideg 1 n sósavval pH=2,5-re savanyítjuk és etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos részt vízzel egyszer kimossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot petroléterben feloldjuk, és éjszakán át 4 °C hőmérsékleten állni hagyjuk. Az így módon kapott kristályos anyagot kiszűrjük és megszáritjuk, így 11,3 g (hozam: 100%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 104–108 °C.

Analízis a C₁₄H₁₈NO₄F-re (283,3) képlet alapján: számított: C: 59,36%, H: 6,40%, N: 4,94%, talált: C: 59,44%, H: 6,67%, N: 4,71%.

[α]_D²⁵ = +11,88° (c = 2,0, etanol).

d) lépés

N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-p-fluor-fenil-alanin-amid

75 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 10 g (0,035 mól), a c) lépésben leírt módon nyert terméket. Utána az elegyet -15 °C hőmérsékletre hűtjük, és hozzáadunk 3,9 ml (0,035 mól) N-metil-morfolint és 4,6 ml (0,035 mól) klórhangyasav-izo-butyl-észtert. A reakcióelegyet 5 percig -15 °C hőmérsékleten keverjük, majd 1 órán át vízmentes ammóniát vezetünk bele. Ezután a reakcióelegyet további 4 órán át -15 °C hőmérsékleten keverjük, majd jég és 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldat elegyére öntjük. A vizes elegyet etil-acetáttal kirázzuk, a szerves részt vízzel, utána 1,5 n citromsav-oldattal, és végül vízzel mossuk. A szerves részt magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradék olajat dietil-éterben feloldjuk, és az oldatot éjszakán át 4 °C hőmérsékleten állni hagyjuk. A kivált csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk, így módon 8,1 g (hozam: 82%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 149–152 °C.

[α]_D²⁵ = +7,92° (c = 0,5, metanol).

Analízis C₁₄H₁₉N₃O₃F-re (282,3): számított: C: 59,56%, H: 6,79%, N: 9,92%, talált: C: 59,31%, H: 6,85%, N: 9,90%.

e) lépés

L-p-Fluor-fenil-alanin-amid, sósavas só

50 ml, frissen készített, 1 n, ecetsavas sósav-oldat és 5 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 7,8 g (0,028 mól), a d) lépésben leírt módon előállított terméket. Az elegyet fél órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd dietil-éterbe öntjük, és a kivált csapadékot ki-

szűrjük és megszáritjuk. Ily módon 6,0 g (hozam: 98%) cím szerinti vegyületet kapunk, op.: 249-251 °C $[\alpha]_D^{25} = +15,77^\circ$ ($c = 0,51$, metanol).
 Analízis a $C_{10}H_{12}N_2OClF$ (218,66) képlet alapján:
 számított: C: 49,44%, H: 5,53%, N: 12,81%,
 talált: C: 49,64%, H: 5,83%, N: 13,08%.

f) lépés

L-(N^α-Etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

50 ml vízmentes etanolhoz hozzáadunk 4,4 g (0,02 mól), az e) lépésben leírt módon előállított terméket, majd 6,72 g (0,08 mól) szilárd, vízmentes nátrium-hidrogén-karbonátot, és ezután 1,6 ml (0,02 mól) etil-jodidot. Utána a reakcióelegyet 5 órán át forraljuk, majd az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot kloroformban feloldjuk, és az oldatot felvisszük egy 40x3 cm méretű, szilikagéllal (Grace és Davison, grade 62) töltött oszlopra. Az oszlopot kloroformmal, majd 10%-ig növekvő mennyiségű metanol tartalmazó kloroformmal eluáljuk, és a frakciókat vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel értékeljük. A megfelelő frakciókból 2,0 g (hozam: 47%) cím szerinti vegyületet kapunk.
 NMR-spektrum: $\delta = 1,2$ (H-N), 6,8-7,3 (p-fluor-fenil-csoport).

g) lépés

N^α-tercier-butoxi-karbonil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

20 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 1,9 g (9 mmól), az f) lépésben leírt módon nyert terméket, az elegyet 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és hozzáadunk 2,4 g (9 mmól) N^α-tercier-butoxi-karbonil-D-alanil-glicint, utána 1,22 g (9 mmól) 1-hidroxibenzotriazol, és végül 1,86 g diciklohexil-karbodiimidet. A reakcióelegyet 4 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 72 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és a csapadékot kiszűrjük. A szűrletről az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradékot feloldjuk etil-acetátban és az oldatot 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, utána vízzel, ezután 1,5 n citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk. Vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot acetonnal feloldjuk, és felvisszük három preparatív vékonyréteg-kromatográfiás lemezre. A lemezeket kloroform és metanol 9:1 arányú elegyében futtatjuk, a fő komponens tartalmazó szilikagélt lekaparjuk a lemezről, és a terméket leoldjuk róla. Ily módon 1,7 g (hozam: 43%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = 32,17^\circ$ ($c = 0,516$, metanol).

Analízis a $C_{27}H_{36}N_4O_7F$ (438,5) képlet alapján:
 számított: C: 57,52%, H: 7,13%, N: 12,78%,
 talált: C: 57,42%, H: 7,29%, N: 12,81%.

h) lépés

L-Tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid, ecetsavas só

20 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,5 g (3,6 mmól), a g) lépésben leírt módon nyert terméket. A reakcióelegyet fél órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószer csökkentett nyomáson, melegítés nélkül ledesztilláljuk. Az olajos maradékot dietil-éterrel hígítjuk, az oldószer leöntjük, és a maradék olajat csökkentett nyomáson megszáritjuk.

1,03 g (3,6 mmól) N^α-tercier-butoxi-karbonil-L-tirozint feloldunk 5 ml dimetil-formamidban, és az

oldához -15 °C hőmérsékleten, keverés közben hozzáadunk 0,4 ml (3,6 mmól) N-metil-morfolint és 0,48 ml (3,6 mmól) klórhangyasav-izobutil-észtert. A reakcióelegyet -15 °C hőmérsékleten tovább keverjük, és eközben elkészítjük az alábbi elegyet:

A fenti, első bekezdésben leírt módon elkészített tripeptid-trifluor-ecetsavas sót feloldjuk 5 ml dimetil-formamidban, és az elegyhez 0 °C hőmérsékleten egyszerre hozzáadunk 0,4 ml N-metil-morfolin, és a reakció teljessé tétele érdekében az oldatot keverjük. Ezt az oldatot hozzáadjuk a vegyes anhidrid fent leírt módon elkészített oldatához, és a reakcióelegyet 4 órán át keverjük. Utána az elegyet jeges 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldatra öntjük, és a vizes oldatot etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos részt vízzel, utána 1,5 n citromsav-oldattal, majd megint vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és csökkentett nyomáson ledesztilláljuk.

Az olajos maradékot (súlya: 1,7 g) feloldjuk 15 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyében, és az elegyet fél órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük. Ezután az oldatot fagyaszttva szárítjuk, a szilárd maradékot puffer-oldatban (amely 1% piridint és 0,05% ecetsavat tartalmaz) 10 ml térfogatra oldjuk. Az oldatot felvisszük egy 2,5x9,0 cm méretű, DEAE Sephadex A 25-tel töltött oszlopra, amelyet előzőleg ugyanezzel a puffer-oldattal egyensúlyba hoztunk. Az oszlopot a fenti puffer-oldattal eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk, a megfelelő frakciókat egyesítjük és fagyaszttva szárítjuk. A fehér színű, szilárd maradékot feloldjuk 10 ml 0,2 n ecetsavban, és az oldatot felvisszük egy 2,5x90 cm méretű Saphadex G-10-zel töltött oszlopra. Az oszlopot 0,2 n ecetsavval eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk. A megfelelő frakciókat egyesítjük és fagyaszttva szárítjuk, így módon fehér színű, szilárd anyag formájában 1,18 g (hozam: 58%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = +14,62^\circ$ ($c = 0,5$, 1 n sósav).

Analízis a $C_{27}H_{36}N_4O_7F$ (561,6) képlet alapján:
 számított: C: 57,7%, H: 6,46%, N: 12,47%,
 talált: C: 57,53%, H: 6,65%, N: 12,19%.

Aminosav-analízis: Tyr: 9,88, Ala: 0,99, Gly: 1,00, NH₃: 1,06.

2. példa

L-Tirozil-D-treonil-glicil-L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

a) lépés

N^α-tercier-butoxi-karbonil-glicil-L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

20 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 2,4 g (11,4 mmól) L-(N^α-etil)-p-fluor-fenil-alanin-amidot, majd az elegyhez 0 °C hőmérsékleten hozzáadunk 1,99 g (11,4 mmól) N^α-tercier-butoxi-karbonil-glicint, majd 1,54 g (11,4 mmól) 1-hidroxibenzotriazol, és végül 2,35 g (11,4 mmól) diciklohexil-karbodiimidet. A reakcióelegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 72 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 0 °C hőmérsékletre hűtjük, a csapadékot kiszűrjük és a szűrletről az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A maradékot feloldjuk etil-acetátban, majd az oldatot 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, utána vízzel, ezután 1,5 n citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk. Vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk kloroformban, és felvisszük egy 40x3 cm méretű, szil-

likagéllel (Grace és Davison, grade 62) töltött oszlopra. Az oszlopot kloroformmal, majd 5%-ig növekvő mennyiségű metanolt tartalmazó kloroformmal eluáljuk, és a terméket vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel azonosítjuk. A megfelelő frakciókat egyesítve 2,9 g (hozam: 69%) cím szerinti vegyületet kapunk. $[\alpha]_D^{25} = -93,2^\circ$ ($c = 0,5$, metanol).

Analízis a $C_{18}H_{26}N_3O_4F$ (367,4) képlet alapján: számított: C: 58,84%, H: 7,13%, N: 11,44%, talált: C: 58,74%, H: 7,24%, N: 11,13%.

b) lépés

N^α -tercier-butoxi-karbonil-L-triazol-D-treonil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

20 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,47 g (4 mmól), az a) lépésben leírt módon nyert terméket. Az elegyet fél órán át $0^\circ C$ hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson, melegítés nélkül ledesztilláljuk. Az olajos maradékhoz dietil-étert adunk, majd az oldószert leöntjük, és a maradék olajat csökkentett nyomáson megszáritjuk.

1,6 g (4 mmól) N^α -tercier-butoxi-karbonil-D-treonin, diciklohexil-amin-sót feloldunk etil-acetát és 1,5 n citromsav-oldat kétfázisú elegyében. Az etil-acetátos részt elválasztjuk, vízzel egyszer mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk 5 ml dimetil-formamidban, az oldatot $-15^\circ C$ hőmérsékletre hűtjük, és keverés közben gyorsan hozzáadunk 0,44 ml (4 mmól) N-metil-morfolin, és 0,53 ml (4 mmól) klórhangyasav-izobutil-észtert. Az elegyet $-15^\circ C$ hőmérsékleten tovább keverjük, miközben elkészítjük az alábbi elegyet:

Az első bekezdésben leírt módon előállított dipeptid-trifluor-ecetsavas sót feloldjuk 5 ml dimetil-formamidban, és $0^\circ C$ hőmérsékleten egyszerre hozzáadunk 0,44 ml N-metil-morfolint. A reakció teljessé tétele érdekében az oldatot keverjük. Ezt a keveréket gyorsan hozzáadjuk a fenti bekezdésben leírt módon elkészített vegyes anhidrid-oldathoz, és a reakcióelegyet 4 órán át keverjük. Utána jeges 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldatra öntjük, és a vizes oldatot etil-acetáttal kirázzuk. A szerves részt vízzel, utána 1,5 n citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradék súlya: 1,6 g.

A fenti olajos maradékból 1,5 g-ot (3,21 mmól) feloldunk 15 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyében. A reakcióelegyet fél órán át $0^\circ C$ hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson, melegítés nélkül ledesztilláljuk. Az olajos maradékhoz dietil-étert adunk, és a kapott csapadékot kiszűrjük és csökkentett nyomáson megszáritjuk.

902 mg (3,21 mmól) N^α -tercier-butoxi-karbonil-L-tirozint feloldunk 5 ml dimetil-formamidban, és az oldathoz $-15^\circ C$ hőmérsékleten, keverés közben gyorsan hozzáadunk 0,35 ml (3,21 mmól) N-metil-morfolint, és 0,42 ml (3,21 mmól) klórhangyasav-izobutil-észtert. A reakcióelegyet $-15^\circ C$ hőmérsékleten tovább keverjük, miközben elkészítjük az alábbi elegyet.

A fenti leírt módon elkészített tripeptid-trifluor-ecetsavas sót feloldjuk 5 ml dimetil-formamidban, és az oldathoz $0^\circ C$ hőmérsékleten egyszerre hozzáadunk 0,35 ml N-metil-morfolin. A reakció teljessé

tétele érdekében az elegyet keverjük. Ezután ezt az elegyet hozzáadjuk az előző bekezdésben leírt módon elkészített vegyes anhidrid oldathoz, és a reakcióelegyet 4 órán át $-15^\circ C$ hőmérsékleten, majd éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 1 n jeges nátrium-hidrogén-karbonát-oldatra öntjük, és a vizes oldatot etil-acetáttal kirázzuk. A szerves részt elválasztjuk, vízzel, utána 1,5 n citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk acetonnal, és az oldatot felvisszük három preparatív vékonyréteg-kromatográfiás lemezre. A lemezeket kloroform és metanol 9:1 arányú elegyében futtatjuk, a fő komponens tartalmazó szilikagélt lekaparjuk, és a terméket leoldjuk róla. Ily módon 1,4 g (hozam: 55%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = -36,14^\circ$ ($c = 0,5$, metanol).

Analízis a $C_{31}H_{42}N_5O_8F$ (631,7) képlet alapján: számított: C: 58,99%, H: 6,70%, N: 11,09%, talált: C: 57,24%, H: 6,70%, N: 10,46%.

c) lépés

L-Tirozil-D-treonil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid, ecetsavas só

15 ml trifluor-ecetsav és 2 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,3 g (2,06 mmól), a b) lépésben leírt módon nyert terméket. Az elegyet fél órán át $0^\circ C$ hőmérsékleten keverjük, majd fagyaszta száritjuk. A szilárd maradékot puffer-oldattal (amely 1% piridint és 0,05% ecetsavat tartalmaz), 10 ml térfogatra oldjuk, és az oldatot felvisszük egy 2,5x90 cm méretű, acetát-formában lévő DEAE Sephadex A-25-tel töltött oszlopra, amelyet előzőleg ugyanezzel a puffer-oldattal egyensúlyba hoztunk. Az oszlopot a fenti puffer-oldattal eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk, és a megfelelő frakciókat egyesítjük, majd fagyaszta száritjuk. A szilárd maradékot feloldjuk 10 ml 0,2 n ecetsavban, és az oldatot felvisszük egy 2,5x90 cm méretű, Sephadex G-10-zel töltött oszlopra, amelyet előzőleg 0,2 n ecetsav-oldattal hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot 0,2 n ecetsav-oldattal eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk, a megfelelő frakciókat egyesítjük és fagyaszta száritjuk. Ily módon 1,6 g (hozam: 87%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = -8,66^\circ$ ($c = 0,5$, 1 n sósav).

Analízis a $C_{28}H_{38}N_5O_8F$ (591,6) képlet alapján: számított: C: 56,84%, H: 6,47%, N: 11,84%, talált: C: 56,93%, H: 6,48%, N: 11,94%.

Amionsav-analízis: Tyr: 1,00, Thr: 0,99, Gly: 0,99, NH_3 : 1,09.

3. példa

L- N^α -metil-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid ecetsav só

a) lépés

N^α -butoxi-karbonil- N^α -metil-O-benzil-L-tirozin, d(+)- α -metil-benzil-amin-só

40 ml, molekulaszűrőn száritott tetrahidro-furánhoz hozzáadunk 9,28 g (25 mmól) N^α -butoxi-karbonil-O-benzil-L-tirozint. Ezt az oldatot fél óra alatt hozzácepegtetjük 75 mmól kálium-hidrid és 0,125 g 18-korona-6-éter 100 ml vízmentes tetrahidro-furánnal készült, nitrogén-atmoszférában $0^\circ C$ hőmérsékleten kevert elegyéhez. Ezután a reakcióelegyhez 5 perc alatt hozzácepegtetjük 3,12 ml (0,05 mól) metil-jodid 10 ml vízmentes tetrahidro-furánnal készült oldatát. A reakcióelegyet 2,5 órán át $0^\circ C$ hőmérsékleten

keverjük, majd hozzáadunk 5 ml ecetsavat, és 10 ml etil-alkoholt. A kész elegyet 200 g darabos jégre öntjük, és a vizes elegy pH-ját 1 n kálium-hidroxid-oldattal 10–11-re állítjuk, majd dietil-éterrel kétszer kirázzuk. Ezután a vizes részt pH-ját hideg citromsav-oldattal 3,0-ra állítjuk, majd dietil-éterrel háromszor kirázzuk. A szerves részt vízzel kétszer kimossuk, vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk dietil-éterben, és az oldathoz hozzáadunk 3,22 ml (0,025 mól) d-(+)- α -metil-benzil-amint. Az elegyhez petrolétert adunk, és a kikristályosodó csapadékot kiszűrjük és megszáritjuk. Ily módon 11,59 g (hozam: 91%) cím szerinti vegyületet kapunk, $[\alpha]_D^{25} = -126$ – -128 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -31,4$ ° (c = 1, kloroform).

Analízis a $C_{20}H_{38}N_2O_7$ (506,6) képlet alapján:

számított: C: 71,12%, H: 7,56%, N: 5,53%,

talált: C: 71,38%, H: 7,33%, N: 5,71%.

b) lépés

N^{α} -tercier-butoxi-karbonil- N^{α} -metil-L-tirozil-D-alanin

30 ml dimetil-formamidhoz hozzáadunk 2,73 g (7,1 mmól) N^{α} -tercier-butoxi-karbonil- N^{α} -metil-O-benzil-L-tirozint (amelyet 3,6 g, az a) lépésben leírt módon nyert termékéből savanyítás és dietil-éteres kirázás útján nyerünk), majd az oldathoz 0 °C hőmérsékleten hozzáadunk 2,36 g (7,1 mmól) D-alanin-benzil-észter, p-toluol-szulfonsavas sót, és utána 0,794 g (7,1 mmól) trietilén-diamint. Az elegyet 5 percig 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd hozzáadunk 0,96 g 1-hidroxi-benzotriazol és 1,46 g (7,1 mmól) diciklohexil-karbodiimidet. A reakcióelegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 24 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 0 °C hőmérsékleten hűtjük, a csapadékot kiszűrjük, és a szűrletről az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az olajos maradékot feloldjuk etil-acetátban, és az oldatot 1 n vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, utána vízzel, ezután 1,5 n citromsav-oldattal, és végül megint vízzel mossuk, és vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. Az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradék olajat feloldjuk 60 ml etanolban, és az oldathoz vizes szuszpenzió formájában hozzáadunk 1,5 g 5%-os csontszén-palládium katalizátort. A reakcióedényt nitrogénnel átöblítjük, majd az elegyet 24 órán át hidrogénezzük. Ezután az edényt megint nitrogénnel átöblítjük, a katalizátort kiszűrjük, és a szűrletről az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Ily módon amorf, szilárd anyag formájában 2,5 g (hozam: 99%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = -54,11$ ° (c = 0,5, metanol).

Analízis a $C_{28}H_{42}N_2O_7$ (366) képlet alapján:

számított: C: 59,00%, H: 7,15%, N: 7,65%,

talált: C: 63,30%, H: 7,65%, N: 8,51%.

c) lépés

N^{α} -tercier-butoxi-karbonil- N^{α} -metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^{α} -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid

15 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,1 g (2,99 mmól) N^{α} -tercier-butoxi-karbonil-glicil-L-(N^{α} -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amidot, az elegyet fél órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson melegítés nélkül ledesztilláljuk. Az olajos maradékhoz dietil-étert adunk, majd az oldószert leöntjük, és a maradék olajat csökkentett nyomáson megszáritjuk. 5 ml dimetil-forma-

midhoz hozzáadunk 1,09 g (2,99 mmól), a b) lépésben leírt módon nyert terméket. Az oldathoz -15 °C hőmérsékleten, keverés közben gyorsan hozzáadunk 0,3 ml (2,99 mmól) N-metil-morfolint és 0,39 ml (2,00 mmól) klórhangyasav-izobutil-észtert. Az elegyet -15 °C hőmérsékleten tovább keverjük, miközben elkészítjük az alábbi elegyet:

A fent leírt módon elkészített dipeptid-trifluor-ecetsavas sót feloldjuk 5 ml dimetil-formamidban, és 0 °C hőmérsékleten egyszerre hozzáadunk 0,3 ml N-metil-morfolint. A reakció teljessé tétele érdekében az oldatot keverjük. Ezt az elegyet egyszerre hozzáadjuk a vegyes anhidrid fent leírt módon elkészített oldathoz, és a reakcióelegyet 4 órán át -15 °C hőmérsékleten keverjük. Utána jeges 1 n nátrium-hidrogén-karbonát-oldatra öntjük, és a vizes oldatot etil-acetáttal kirázzuk. A szerves részt elválasztjuk, vízzel, utána 1,5 n citromsav-oldattal, majd megint vízzel mossuk, és vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. Az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, így módon 2 g olajos terméket kapunk. Ezt az olajos terméket feloldjuk acetonban, és az oldatot felvisszük három preparatív vékonyréteg-kromatográfiás lemezre. A lemezeket kloroform és metanol 9:1 arányú elegyében futtatjuk, a fő komponenszt tartalmazó szilikagélts lekaparjuk, és a terméket leoldjuk róla. Ily módon 1,3 g (hozam: 71%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = -76,8$ ° (c = 0,5, metanol).

Analízis a $C_{31}H_{42}N_2O_7$ (615,7) képlet alapján:

számított: C: 60,47%, H: 6,88%, N: 11,37%,

talált: C: 60,27%, H: 6,61%, N: 11,14%.

d) lépés

L- N^{α} -metil-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^{α} -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid, ecetsavas só

15 ml trifluor-ecetsav és 3 ml anizol elegyéhez hozzáadunk 1,1 g (1,78 mmól), a c) lépésben leírt módon előállított terméket. Az elegyet fél órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd fagyaszttva szárítjuk. A szilárd maradékot puffer-oldatban (amely 1% piridint és 0,05% ecetsavat tartalmaz) 10 ml térfogatra oldjuk, és az oldatot felvisszük egy 2,5x90 cm méretű, acetát-formában lévő Sephandex DEAE A-25-tel töltött oszlopra, amelyet előzőleg ugyanezzel a puffer-oldattal egyensúlyba hoztunk. Az oszlopot a fenti puffer-oldattal eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk, a megfelelő frakciókat egyesítjük és fagyaszttva szárítjuk. A szilárd maradékot feloldjuk 10 ml 0,2 n ecetsav-oldatban, és az oldatot felvisszük egy 2,5x90 cm méretű, 0,2 n ecetsav-oldattal egyensúlyba hozott Sephandex G-10-zel töltött oszlopra. Az oszlopot 0,2 n ecetsav-oldattal eluáljuk, a frakciókat 280 nm-nél vizsgáljuk, a megfelelő frakciókat egyesítjük, és fagyaszttva szárítjuk. Ily módon 0,801 g (hozam: 78%) cím szerinti vegyületet kapunk.

$[\alpha]_D^{25} = -1,57$ ° (c = 0,5 1n sósav).

Analízis a $C_{28}H_{38}N_2O_7F$ (575,64) képlet alapján:

számított: C: 58,42%, H: 6,65%, N: 12,17%,

talált: C: 58,67%, H: 6,40%, N: 12,42%.

Aminosav-analízis: Ala: 0,99, Gly: 1,01, NH_3 : 0,96.

Az 1 általános képletű vegyületek fájdalomcsillapító hatását egéren hot-plate (fűtőlapos)-módszerrel mutatjuk ki. E célból a kísérleti állatot egy függőlegesen álló, plexiüvegből készült hengerbe helyezzük, amelynek alaplapja egy 52 °C hőmérsékletre felmelegített fűtőlap. Az egereknek ordílan vagy szubku-

tán injekció formájában beadjuk a vizsgálandó anyag megfelelő mennyiségének valamely vívőanyaggal készült oldatát vagy szuszpenzióját, és az állatot 15 perc múlva rátesszük a fűtőlapra. Meghatározzuk azt a másodpercekben mért késleltetési időt, amelynek elteltével az egér felugrik a forró felületről. Ha valamely anyagnak fájdalomcsillapító hatása van, akkor ezt beadva hosszabb késleltetési időt mérünk, mint azoknál az egereknél, amelyek csak a vívőanyagot kapják. A mérést olyan dózistartományban kell végeznünk, amely dózis még nem zavarja meg az állatok mozgásának koordináltságát, és nem teszi őket mozgásképtelenné. Az alábbi táblázatban megadjuk a fent leírt módon mért ED_{50} -értékeket.

Táblázat
Fájdalomcsillapító hatás hő-plate módszer

Vegyület	ED_{50} , mg/kg szubkután	ED_{50} , mg/kg orális
1. példa	0,00018	19,00
2. példa	0,01210	—
3. példa	0,01170	3,55

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az I általános képletű, ahol R_1 jelentése hidrogénatom vagy 1–3 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport, R_2 jelentése metilcsoport vagy hidroxil-etil-csoport R_3 jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomot tartalmazó, primer alkilcsoport és

L és D az illető szénatom konfigurációját jelölik, tetrapeptid-származékok acetátjainak előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy valamely, a peptidkémiaiában szokásos módon védett I általános képletű, ahol R_1 , R_2 és R_3 a fenti, vegyületről a védőcsoportot (vagy védőcsoportokat) szokásos módon lehasítjuk, majd a terméket ecetsavval kezeljük.

5

10

15

20

25

30

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a védőcsoportok lehasítására trifluoecetsavat használunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy gyantahordozóra felvitt kiindulási anyagot használunk, és a védőcsoportokat 0°C hőmérsékleten hidrogén-fluoriddal hasítjuk le.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid-acetátsó előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy N^α -tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-alanin-glicil-L-(N^1 -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval, majd ecetsavval kezelünk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja L-tirozil-D-treonil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid-acetátsó előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy N^α -tercier-butoxi-karbonil-L-tirozil-D-treonil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval, majd ecetsavval kezelünk.

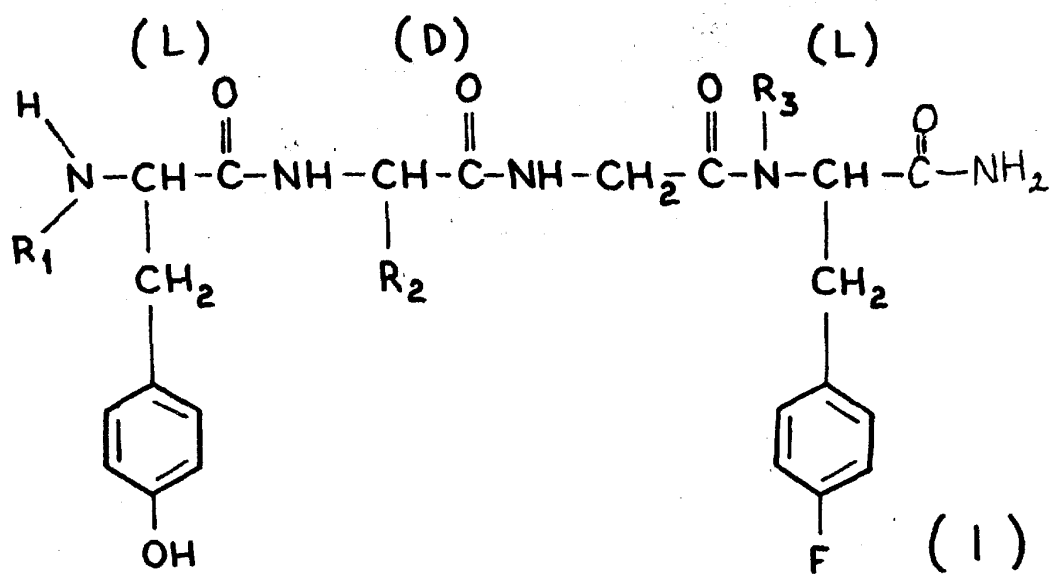
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja L- N^α -metil-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amid-acetátsó előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy N^α -tercier-butoxi-karbonil- N^α -metil-L-tirozil-D-alanil-glicil-L-(N^α -etil)-p-fluor-fenil-alanin-amidot trifluor-ecetsavval, majd ecetsavval kezelünk.

35

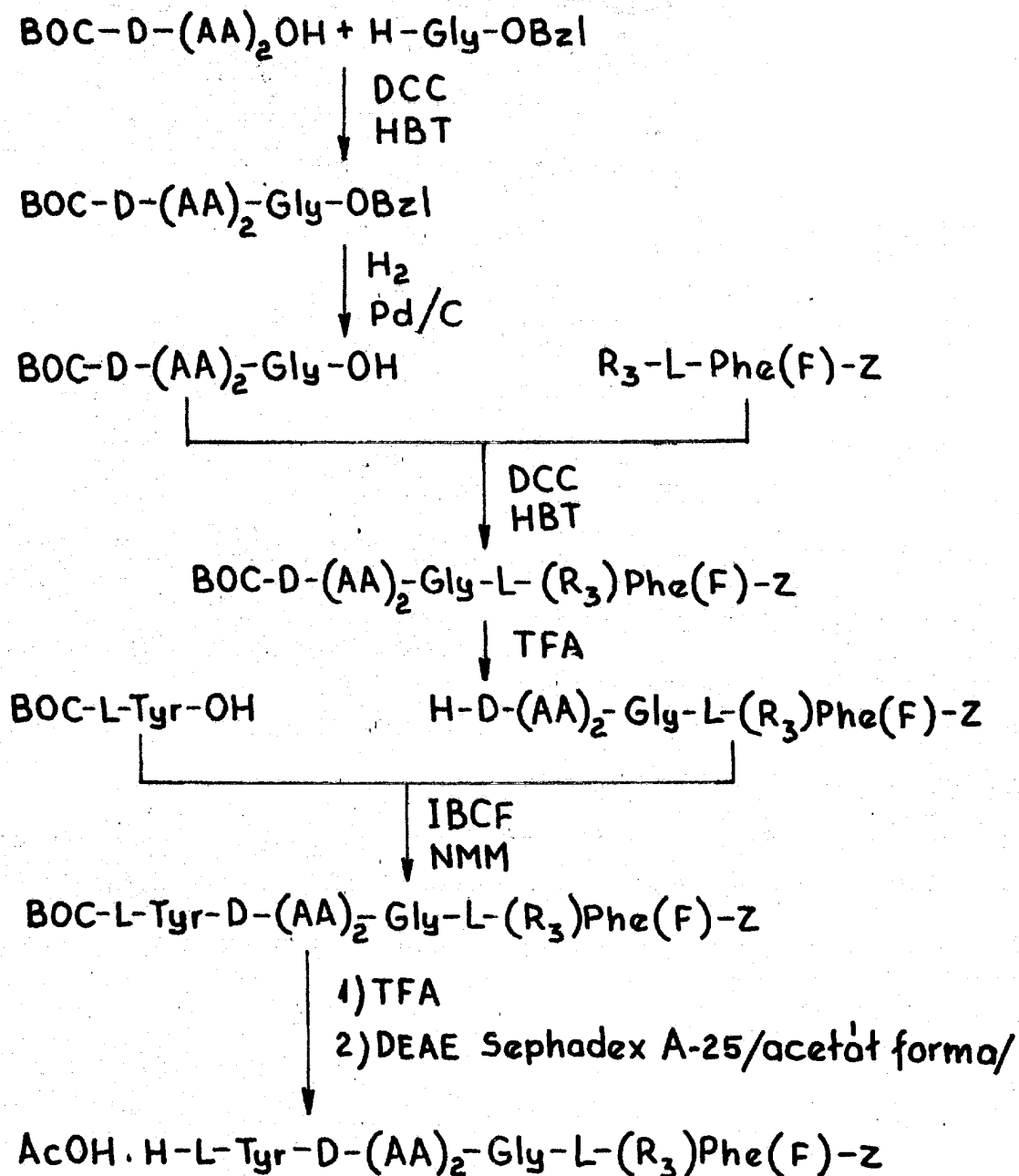
3 db rajz

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX



A-reakcióvázlat



B-reakcióvázlat

