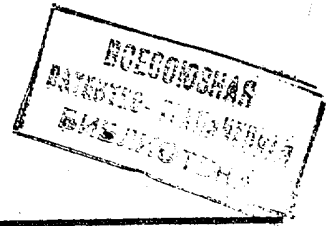




ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 2691552/23-04
(22) 23.11.78
(31) 48980/77
(32) 24.11.77
(33) GB
(46) 30.03.89. Бюл. № 12
(71) Дэе Велкам Фаундейшн Лимитед
(GB)
(72) Сэмюэль Вилкинсон (GB)
(53) 547.964.4.07(088.8)
(56) Шредер Э, Любке К. Пептиды. М.:
Мир, 1967, ч. I, с. 116.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ ИЛИ
ИХ КИСЛОТНО-АДДИТИВНЫХ СОЛЕЙ
(57) Изобретение касается производ-
ства пептидов, в частности пептида
ф-лы I $\text{H-Tyr-X-Gly-Phe(4-NO}_2\text{)-Pro-}$
 -NH_2 , где X=D-Met или D-Met(0) , или
их кислотно-аддитивных солей, кото-
рые как биологически-активные ве-

щества могут быть использованы в ме-
дицине. Цель - создание новых более
активных и менее токсичных веществ
указанного класса. Синтез пептида ве-
дут реакцией трипептида II с дипеп-
тидом III Hoc-Tyr-X-GlyOH (II) и
 $\text{H-Phe(4-NO}_2\text{)-Pro-Y}$ (III), где X -
указано; Y = NH_2 или OCH_3 . Получен-
ный пентапептид при необходимости
(когда Y = OCH_3) обрабатывают аммиа-
ком (перевод в NH_2 -группу) с после-
дующим отщеплением защитной группы
(Hoc) и выделением целевого продук-
та в свободном виде или в виде кис-
лотно-аддитивной соли. Новые пептиды
обладают противодиарейной, противо-
кашлевой и анальгетической активнос-
тью при дозах 0,02-0,03 мг/кг,
10 мг/кг и 50 мг/кг соответственно
при токсичности LD_{50} 500 мг/кг.
1 табл.

Изобретение относится к способу
получения пептидов или их кислотно-
аддитивных солей - новых биологичес-
ки активных соединений, которые
могут найти применение в медицине.

Цель изобретения - способ получе-
ния новых производных в ряду пепти-
дов, малотоксичных и обладающих вы-
сокой противодиарейной, противокашле-
вой и анальгетической активностью.

Приняты следующие сокращения:
DMF - диметилформамид; THF - тетра-
гидрофуран; DCCl - дициклогексил-
карбодиимид; HOBT - 1-оксibenзотри-
азол; NMM - N-метилморфолин; DCV -

дициклогексилмочевина; BOC - третич-
ный бутилоксикарбонил.

Хроматографию осуществляют в тон-
ком слое силикагеля на пластинах фир-
мы Мерс с использованием следующих
систем растворителей.

2. Смесь n-бутанола, уксусной кис-
лоты и воды в соотношении 3:1:1.

3. Хлороформ:метанол:32%-ная уксус-
ная кислота 120:90:40, 4 хлороформ:
метанол:32%-ный аммиак 120:90:40.

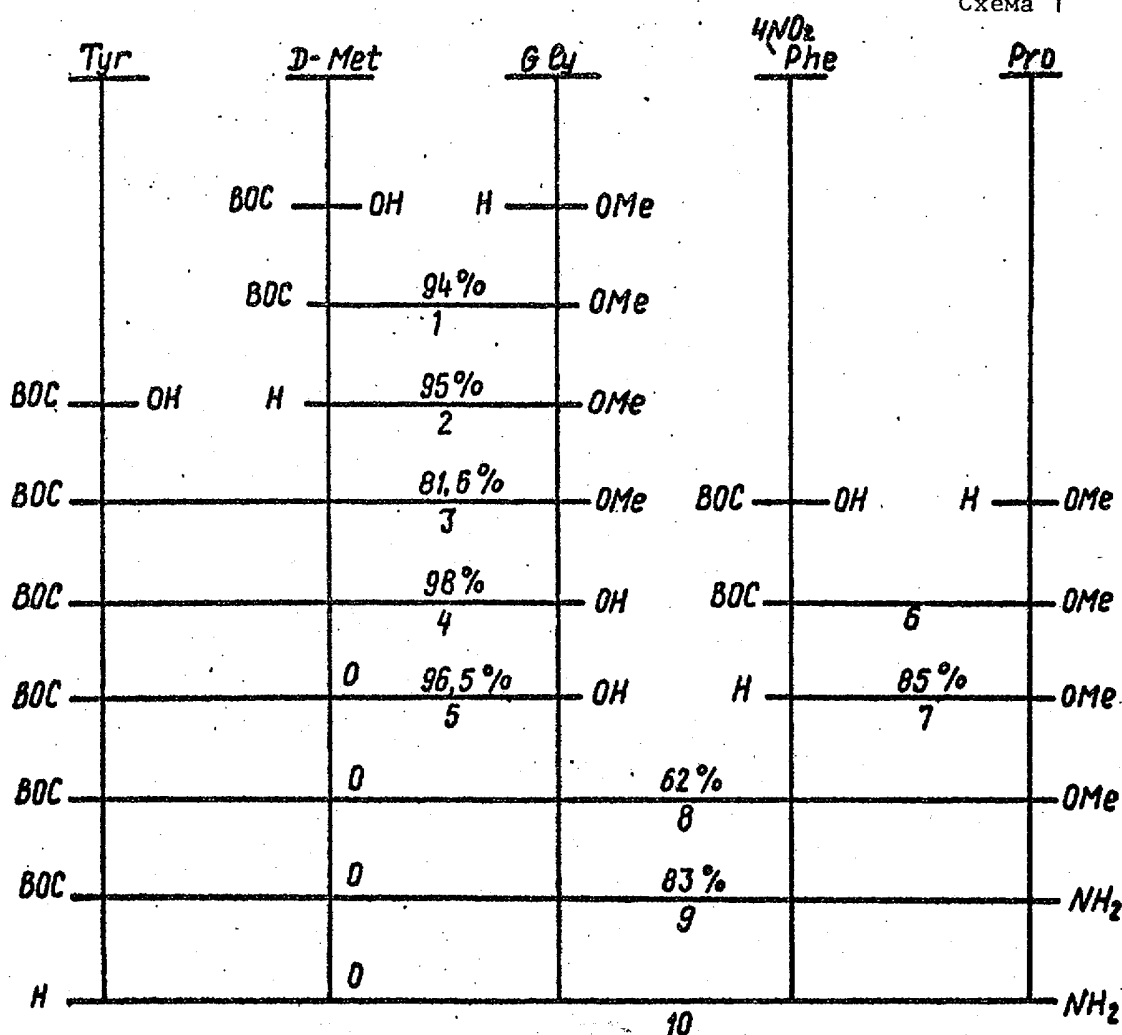
7. Смесь хлороформа, метанола и
32%-ного водного раствора уксусной
кислоты в соотношении 120:90:5.

8. Смесь хлороформа, метанола и
0,880 аммиака в соотношении 120:90:5.

Высокоразрешающую жидкостную хроматографию проводят на колонках: Zor-вах C-8, 4,6 мм x 25 см, в качестве подвижной фазы используют

смесь ацетонитрила и 0,1 М ацетата аммония, pH 4,0. Скорость потока 2 мл/мин, определение при длине волны 254 нм.

Схема 1



Пример 1. H-Tyr-DMet(0)-Gly-Phe(4NO₂)ProNH₂.

BOC-D-Met. Gly. OMe (1).

СНА-соль BOC-D-Met (28,38 г) суспендируют в этилацетате (150 мл) и смешивают полученную суспензию с раствором KHSO₄ (13,5) в воде (75 мл). После полного растворения органическую фазу отделяют, дважды промывают водой (2x60 мл), высушивают над безводным MgSO₄ и концентрируют. Полученную маслянистую жидкость растворяют в тетрагидрофуране (90 мл), охлаждают раствор до -25°C и обрабатывают N-диметилморфолином (6,66 г) и изобутилхлорформатом (8,60 г). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 мин при -15°C и затем обраба-

тывают предварительно охлажденным до -25°C раствором Gly OMe·HCl (7,53 г) и N-метилморфолина (6,06 г) в диметилформамиде (90 мл). После выдержки в течение 2 ч при -15°C реакционную смесь переносят в ледяную баню, обрабатывают 2 М раствором KHCO₃ (72 мл) и перемешивают в течение 30 мин. После этого растворитель отгоняют в вакууме, а остаток распределяют между этилацетатом (350 мл) и водой (75 мл). Органический слой затем промывают 5%-ным раствором лимонной кислоты (2x50 мл), 5%-ным раствором NaHCO₃ (2x50 мл) и водой (2x50 мл). Экстракт высушивают над безводным MgSO₄ и упаривают досуха, после чего сухой остаток растирают с петролевым эфиром.

Выход: 18,12 г (94% от теоретич.).
Результаты тонкослойной хроматографии: одно пятно в 2,7,8.

H, D-Met.Gly.OMe.HCl (2).

BOC-D-Met.Gly.OMe (1) (18,1 г) суспендируют в анизоле (150 мл) и обрабатывают полученную суспензию смесью M HCl и уксусной кислоты (440 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. Образующийся продукт осаждают путем добавления сухого эфира, отделяют его фильтрацией и тщательно промывают сухим эфиром. Полученный сырой продукт растворяют в воде (450 мл) и раствор дважды промывают эфиром для удаления остатков анизола. Водный раствор вымораживают. В результате получают 13,77 г продукта (выход 95% от теоретич.). Результаты тонкослойной хроматографии: чистый продукт (2,7,8).

BOC-Tyr.D-Met.Gly.OMe (3).

BOC-Tyr (16,59 г) растворяют в тетрагидрофуране (80 мл), охлаждают до -25°C и добавляют к нему N-метилморфолин (5,96 г), а затем при быстром перемешивании изобутилхлорформиат (7,69 г). После выдержки в течение 2 мин при -15°C к смеси добавляют предварительно охлажденный раствор D-Met.Gly.OMe.HCl (13,77 г) и N-метилхлорформиата (5,42 г) в диметилформамиде (80 мл) и продолжают перемешивание при -15°C в течение 2,5 ч. Затем смесь помещают в ледяную баню и обрабатывают в течение 30 мин 2 М раствором KHCO_3 (65 мл). Остаток, полученный после отгонки растворителей в вакууме, растворяют в смеси этилацетата (360 мл) и воды (70 мл). Органическую фазу отделяют и промывают 5%-ным раствором лимонной кислоты (2×50 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (2×50 мл) и водой (2×50 мл). После высушивания (MgSO_4) и удаления растворителя твердый остаток растирают с эфиром. В результате получают 21,16 г (81,6% от теоретического выхода) защищенного трипептида. По данным тонкослойной хроматографии (2,7,8), полученный продукт не содержит примесей.

BOC-Tyr.D-Met.Gly (4).

Защищенный трипептид (3) (21,1 г) растворяют в смеси метанола (350 мл) и воды (150 мл) и проводят омыление путем обработки 2 М раствором NaOH (55 мл). Протекание реакции контро-

лируют с помощью тонкослойной хроматографии (7). Установлено, что реакция заканчивается через 45 мин. После окончания реакции метанол отгоняют в вакууме, водный раствор охлаждают льдом и нейтрализуют 1 М раствором HCl (110 мл). Выпадающий в осадок продукт отфильтровывают, промывают несколько раз водой и высушивают над P_2O_5 . Выход: 20,18 г (98% от теоретич.). Результаты тонкослойной хроматографии: одно пятно в 2,7,8.

Рассчитано, %: C 53,73; H 6,61;

N 8,96.

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

Найдено, %: C 53,55; H 6,62;

N 8,76.

BOC-Tyr.D-Met(O).Gly (5).

Раствор BOC-Tyr.D-Met.Gly (5,48) в метаноле (120 мл) обрабатывают двумя эквивалентами перекиси водорода (2,7 мл 29,4%-ного раствора). Протекание реакции контролируют с помощью высокоскоростной колоночной жидкостной хроматографии. После выдержки смеси в течение 20 ч при комнатной температуре ее упаривают досуха и растирают остаток с эфиром. Выход: 5,46 г (96,5% от теоретического). Т.пл. $186-188^{\circ}\text{C}$ (с разложением).

$[\alpha]_{\text{D}}^{23,5} + 1,0^{\circ}$ (C=1, диметилформамид).

$[\alpha]_{\text{D}}^{23,5} - 1,3^{\circ}$ (C = 1, диметилформамид).

Рассчитано, %: C 51,96; H 6,39;
N 8,66.

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$

Найдено, %: C 52,13; H 6,38;

N 8,53.

BOC-Phe(NO₂).Pro.OMe (6).

BOC-Phe(NO₂) (31,0 г) растворяют в диметилформамиде (150 мл), после чего добавляют к полученному раствору 1-окси-бензотриазол (27,0 г), охлаждают смесь до -5°C и затем добавляют к ней дициклогексилмочевину (20,6 г). Смесь выдерживают в течение 30 мин при -5°C , в течение которых к ней добавляют раствор Pro-OMe, HCl (16,55 г) и N-метилморфолина (10,1 г) в диметилформамиде (30 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение 20 ч при 5°C и затем отфильтровывают от дициклогексилмочевины. После упаривания в вакууме получают маслянистую жидкость, которую растворяют в этилацетате (1500 мл) и про-

мывают 5%-ным раствором лимонной кислоты (2×50 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (2×250 мл) и полунасыщенным раствором NaCl (2×250 мл). Органическую фазу высушивают и концентрируют до 500 мл. выпадающий осадок дициклогексилмочевины отфильтровывают, а фильтрат упаривают, получая в результате смолу, которую не идентифицируют.

$\text{H.Phe (NO}_2\text{). Pro.OMe.HCl (7)}$.

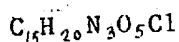
Защищенный дипептид (21,41 г) растворяют в этилацетате (300 мл) и охлаждают полученный раствор до 0°C , после чего пропускают через него сухой газообразный хлористый водород в течение 45 мин, поддерживая температуру 0°C . Затем раствор концентрируют до 50 мл и разбавляют сухим эфиром (300 мл). После вымораживания продукт отфильтровывают, тщательно промывают сухим эфиром и высушивают над смесью P_2O_5 и NaOH .

Выход: 15,64 г (85% от теоретич.)
Т.пл. $145-148^\circ\text{C}$.

$$[\alpha]_D^{25,5} = 15,7^\circ \text{ (C=1, MeOH)}.$$

$$[\alpha]_D^{25,5} = 17,6^\circ \text{ (C=1, MeOH)}.$$

Рассчитано, %: C 50,35; H 5,59;
N 11,75.



Найдено, %: C 50,03; H 5,81;
N 11,45.

$\text{BOC-Tyr.D-Met (0). Gly.Phe (NO}_2\text{). Pro.OMe (8)}$.

Раствор $\text{BOC-Tyr.D-Met(0). Gly (1,0 г)}$ в диметилформамиде (30 мл) охлаждают до -5°C , после чего обрабатывают его 1-оксibenзотриазолом (0,56 г) и дициклогексилкарбодимидом (0,42 г). Смесью перемешивают в течение 40 мин при -5°C , затем добавляют к ней раствор $\text{Phe (NO}_2\text{).Pro.OMe.HCl (0,74)}$ и N-метилморфолина (0,21 г) в диметилформамиде (5 мл) и проводят реакцию сочетания при 5°C в течение 20 ч. выпадающий осадок дициклогексилмочевины отфильтровывают, а фильтрат концентрируют в вакууме. Сырой продукт распределяют между этилацетатом (100 мл) и водой (20 мл). Органический слой промывают 5%-ным раствором лимонной кислоты (2×20 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (2×20 мл) и водой (2×20 мл), высушивают над безводным MgSO_4 и упаривают, получая в результате аморфный

твердый остаток, который после растирания с эфиром весит 1,0 г (62% от теоретич. выхода). По данным тонкослойной хроматографии (2), в полученном продукте присутствует некоторое количество дициклогексилмочевины. дальнейшую очистку не проводят.

$\text{BOC-Tyr.D-Met(0).Gly.Phe (NO}_2\text{)}$.

Pro-NH_2 (9).

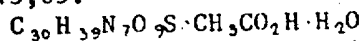
Полностью защищенный пентапептид (1,0 г) растворяют в метаноле (150 мл), раствор охлаждают в смеси льда с солью и насыщают аммиаком.

После этого колбу закрывают и оставляют смесь в течение 6 дней при комнатной температуре. Затем после тщательного удаления аммиака и метанола образующийся продукт экстрагируют смесью этилацетата и эфира. Выход: 0,81 г (83% от теоретич.). По данным тонкослойной хроматографии (2,7,8), полученный продукт содержит некоторое количество дициклогексилмочевины и небольшое количество исходного материала. Полученный продукт используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

$\text{H.Tyr.D-Met (0).Gly.Phe (NO}_2\text{). ProNH}_2$ (10).

$\text{BOC-Tyr.D-Met (0).Gly.Phe (NO}_2\text{). ProNH}_2$ (0,81 г) суспендируют в анизоле (14 мл) и обрабатывают суспензию одномолярной смесью HCl и уксусной кислоты (80 мл). После выдержки реакционной смеси в течение 45 мин при комнатной температуре ее упаривают досуха и остаток растирают с эфиром. Полученный продукт подвергают очистке с помощью ионообменной хроматографии на колонке $2,5 \times 25$ см, заполненной карбоксиметилцеллюлозой. Элюирование осуществляют при линейном градиенте 0,005-0,2 М ацетата аммония при pH 5,1. Выход: 0,33 г. По данным тонкослойной и высокоскоростной колоночной жидкостной хроматографии, полученный продукт не содержит примесей.

Рассчитано, %: C 51,15; H 6,00;
N 13,05.



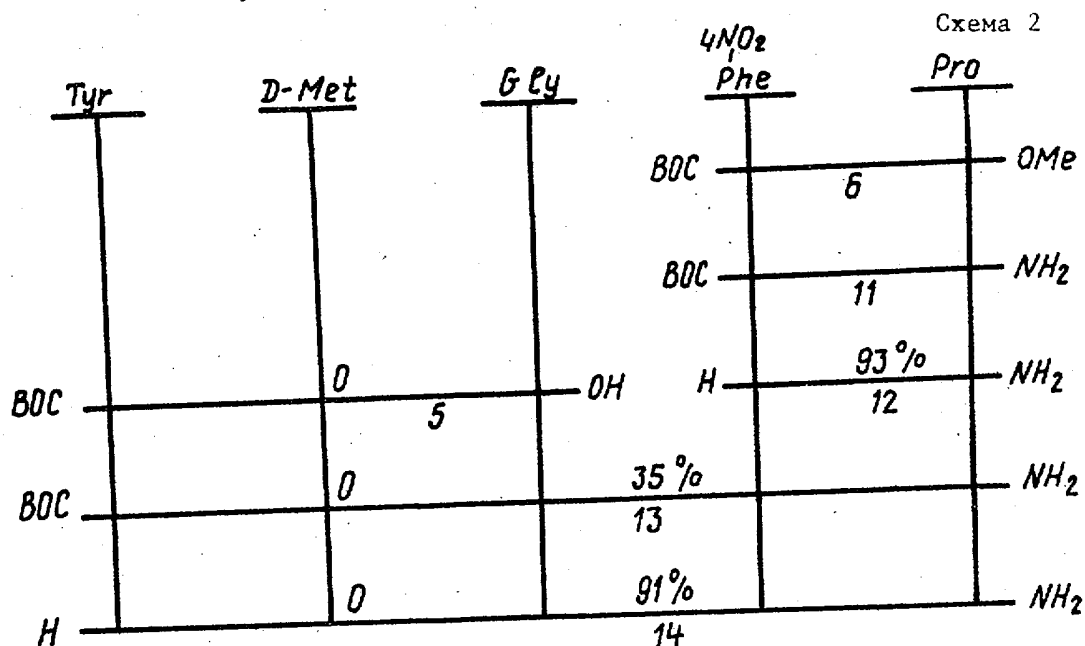
Найдено, %: C 50,83; H 6,06;

N 12,91,

Rf 0,53³, 0,13⁷

$\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$: $[\alpha]_D^{25} + 6,3$ (C=0,2).

Rf = 0,32¹, 0,65³, 0,64⁴.



Пример 2 (см. схема 2).

BOC-Phe (NO₂).Pro.NH₂(11).

BOC-Phe (NO₂).Pro.OMe (6) (22,9 г) растворяют в метаноле (250 мл) и охлаждают полученный раствор льдом, после чего пропускают через него газообразный аммиак до насыщения. Затем колбу закрывают и оставляют при комнатной температуре в течение 7 дней. После этого реакционную смесь упаривают в вакууме и сырой продукт подвергают кристаллизации из этилацетата. По данным тонкослойной и высокоскоростной колоночной жидкостной хроматографии, полученный раствор не содержит примесей.

Т.пл. 176-178,5°C.

$[\alpha]_D^{23} - 29,4^\circ$ (C=1, MeOH).

$[\alpha]_D^{23} - 35,7^\circ$ (C=1, MeOH).

Рассчитано, %: С 56,16; Н 6,40; N 13,79.

C₁₉H₂₄N₄O₆

Найдено, %: С 55,60; Н 6,33;

N 14,04.

H.Phe (NO₂).Pro.NH₂.HCl (12)

BOC-Phe (NO₂).Pro.NH₂ (8,0 г) растворяют в смеси метанола (20 мл), изопропанола (40 мл) и этилацетат (375 мл). Полученный раствор охлаждают льдом и пропускают через него в течение часа газообразный HCl, под- 55

держивая температуру -15°C. После этого через реакционную смесь в течение 5 мин пропускают азот и разбавляют ее сухим эфиром

(450 мл). Образующийся продукт отфильтровывают, тщательно промывают эфиром и высушивают в вакууме над смесью P₂O₅ и NaOH. Выход 6,28 г (93% от теоретич.). Т.пл. 156-159°C.

$[\alpha]_D^{24,5} - 13,5^\circ$ (C=1, MeOH).

$[\alpha]_D^{24,5} - 15,3^\circ$ (C=1, MeOH).

BOC-Tyr.D-Met.Gly.Phe (NO₂).Pro.NH₂ (13).

BOC-Tyr.D-Met (0).Gly (5) (1,0 г) растворяют в диметилформамиде (20 мл) и охлаждают полученный раствор до -25°C, после чего к нему добавляют N-метилморфолин (0,21 г) и изобутилхлорформиат (0,28 г) и интенсивно перемешивают смесь в течение 2 мин, поддерживая ее температуру равной -15°C. Затем к ней добавляют предварительно охлажденный до -25°C раствор Phe (NO₂).Pro.NH₂.HCl (0,71 г) и N-метилморфолина (0,33 г) и перемешивают при -15°C в течение 2,5 ч. После этого реакционную смесь переносят в ледяную баню и обрабатывают 2М КНСО₃ (2,5 мл) в течение 30 мин. Растворители отгоняют в вакууме, а остаток распределяют между этилацетатом (270 мл) и водой (40 мл). Органическую фазу отделяют и промывают 5%-ным раствором лимонной кислоты (2×40 мл), 5%-ным раствором NaHCO₃ (2×40 мл) и водой (2×40 мл). Экстракт высушивают и упаривают досуха. Пос-

ле растирания остатка с эфиром получают 0,56 г продукта (35% от теоретич. выхода). Полученный продукт используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

H.Tyr.D-Met (0).Gly.Phe (NO₂).Pro.NH₂(14).

От Boc-Tyr.D-Met(0).Gly.Phe (NO₂).Pro.NH₂ (0,56 г) отщепляют защитную группу в молярной смеси HCl и уксусной кислоты (56 мл) в присутствии анизол (20 мл). После выдержки в течение 30 мин при температуре окружающей среды реагенты удаляют в вакууме и полученный сырой продукт путем растирания остатков с эфиром. Полученный сырой продукт подвергают хроматографии на колонке 2,5×25 см, заполненной карбоксиметилцеллюлозой. Элюирование осуществляют при линейном градиенте 0,005–0,2 М ацетата аммония при pH 5,1. После такой предварительной очистки пептид снова возвращают в колонку 2,5×50 см, заполненную карбоксиметилцеллюлозой и осуществляют элюирование ацетатом аммония с линейно изменяющейся концентрацией от 0,005 до 0,1 М при pH 5,1. После удаления летучего буфера с помощью проводимой несколько раз сублимационной сушки получают чистый пептид. Выход: 50 мг (91% от теоретич.). По данным тонкослойной (2,7,8) и высокоскоростной колоночной жидкостной хроматографии, полученный продукт не содержит примесей.

Рассчитано, %: С 50,52; Н 6,05; N 12,89.

C₃₀H₃₃N₇O₉S·CH₃CO₂H 1,5 H₂O

Найдено, %: С 50,59; Н 5,96; N 12,97.

Пример 3. H-Tyr-DMet-Gly-Phe(4NO₂)ProNH₂ получают согласно схеме, указанной выше. Продукт выделяют в виде хлористоводородной соли присоединения, а затем чистят на карбоксиметилцеллюлозе (СМС 52) градиентным элюированием буферными растворами уксуснокислого аммония (0,001 М до 0,5 М). После лиофилизации из водного раствора получают уксуснокислую соль присоединения

Rf: 0,52², 0,83³, 0,47⁸

[α]_D²⁵: +8,1° (C=0,2 MeOH).

Фармакологическая активность.

Пептиды указанных примеров испытывали на следующие виды активности

с помощью стандартных фармакологических способов.

Анальгезия в мышцах при испытании горячей пластиной, причем пептид вводят посредством инъекции внутрь мозгового желудочка.

Антидиарейная активность в крысах. В этом способе крысы голодают в течение 24 ч, затем пептид вводят подкожно или орально, после чего через 15 мин дают орально касторовое масло по 1 мл на крысу (ED₅₀ ~ 0,02–0,03 мг/кг).

Для противокашлевого испытания, морских свинок подвергли воздействию аэрозоля, содержащего 20% лимонной кислоты, через 30 мин после введения соединения (орально или подкожно). Подсчитывали число кашлей в течение пятиминутной экспозиции и усредняли значения для шести животных в опыте (ED₅₀ ~ 10 мг/кг р.о.).

Анальгезия в мышцах в испытании с судорогой (модификация способа Гендерсона с сотр.) при оральном введении пептида.

Основное их назначение – лечение диареи.

При испытании на крысах для синтезированных пептидов и морфина были получены следующие значения ED₅₀ (см. таблицу), характеризующие их анальгетическую активность.

Испытуемое соединение	ED ₅₀ , мг/кг	
	перорально	внутривенно
Соединение примера 1	2	0,1
Соединение примера 3	0,05	0,1
Морфин	4	2

Испытываемые пептиды малотоксичны – при введении их по отдельности перорально пяти мышам в количестве 500 мг/кг ни одна из мышей не умерла.

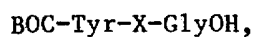
Соединения по изобретению малотоксичны, обладают высокой противо-диарейной, анальгетической и противокашлевой активностью.

Формула изобретения
Способ получения пептидов формулы

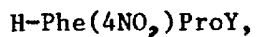
H-Tyr-X-Gly-Phe(4NO₂)Pro-NH₂,

где X-DMet, DMet(0),

или их кислотно-аддитивных солей, отличающийся тем, что трипептид формулы



где X-DMet или DMet(O) подвергают взаимодействию с дипептидом формулы



где $\text{Y}=\text{NH}_2\text{OMe}$, и получаемый при этом пентапептид формулы

- 5 $\text{BOC-Tyr-X-Gly-Phe(4NO}_2\text{)-ProY}$, в случае необходимости, если Y-OMe, при обработке аммиаком заменяют OMe группу на аминогруппу, затем отщепляют защитную группу и целевой
- 10 продукт выделяют в свободном виде или в виде кислотно-аддитивной соли.

Редактор О.Спесивых

Составитель В.Волкова

Техред М.Моргентал

Корректор С.Черни

Заказ 1369/59

Тираж 339

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101