



SUOMI—FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

**[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 62823
UTLÄGGNINGSSKRIFT**

C (45) Patentti myönnetty 10.03.1983
Patent meddelat

(51) Kv.Ik.³/Int.Cl.³ C 07 C 103/52

(21) Patentihakemus — Patentansöknung	760538
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	02.03.76
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	02.03.76
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	09.09.76
(44) Nähtävölkäisen ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.11.82
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	08.03.75
Englanti-England(GB)	10144/75

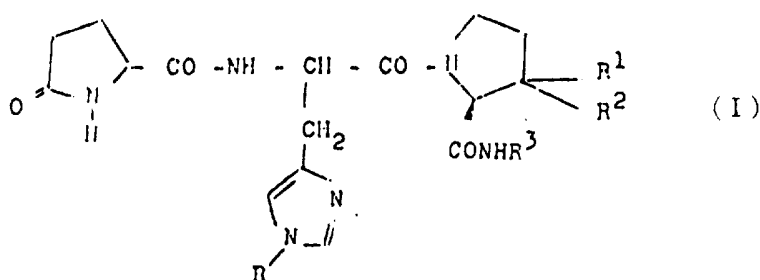
(71) Reckitt & Colman Products Ltd., P.O. Box 26, 1-17 Burlington Lane,
London, Englanti-England(GB)

(72) Barry Arnold Morgan, Hull, Derek John Schafer, Harpenden, Herts.,
Englanti-England(GB)

(74) Leitzinger Oy

(54) Menetelmä terapeuttisesti vaikuttavien histidiinijohdosten valmista-
miseksi - Förfarande för framställning av terapeutiskt verksamma
histidinderivat

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa terapeuttisesti
vaikuttavia histidiinijohdoksia, joiden yleiskaava I on



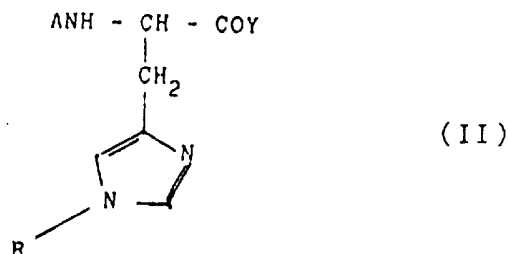
jossa R on vety tai 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä;
R¹ on 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä; R² on vety tai
1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä; R³ on vety tai syklo-
heksyyli- tai heksyyli-ryhmä.

Kaavan 1 mukaiset yhdisteet ovat peräisin aminohapoista, L-pyro-
glutamiinihaposta ja L-histidiinistä, ja kaavan 1 mukaisissa
yhdisteissä histidyyli- ja pyroglutamyyli-ryhmät ovat L-konfi-
guraatiossa.

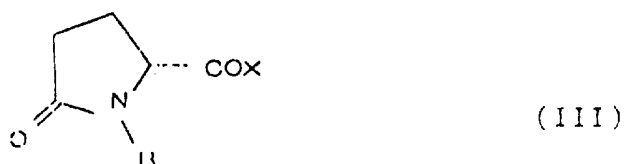
Yhdisteet ovat farmakologisesti aktiivisia hiirillä reserpiini-hypotermia-menetelmässä, kokeessa, jolla testataan anti-depressiivistä aktiviteettia, ja niiden voidaan odottaa olevan hyödyllisiä depression hoidossa. Koska yhdisteet ovat kemiallisesti samankaltaisia kuin hypotalamiinista tyrotropiinia vapauttava hormooni (TRH), L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-L-proliiniamidi, niiden voidaan odottaa vaikuttavan samalla tavoin aivolisäkkeeseen.

Keksinnön mukaan kaavan I mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa seuraavilla menetelmävaihtoehdoilla.

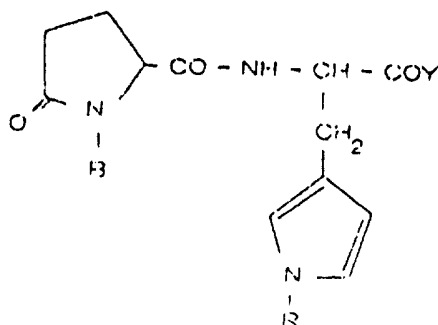
(a) Histidiinijohdos, jonka kaava on



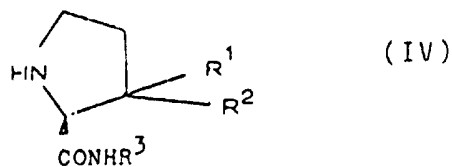
jossa R tarkoittaa edellä määriteltä, A tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen (kuten vetyatomia), ja Y tarkoittaa suojaryhmää (kuten 1 - 4 hiiliatomia sisältävää alempaa alkoksiryhmää), liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on



jossa X tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen, kuten hydroksiryhmää, substituoitua fenoksiryhmää (esim. p-nitro-fenoksia, tri- tai penta-kloorifenoksia) tai atsidoryhmää, ja B tarkoittaa vetyatomia tai suojaryhmää, kuten bentsoyylis-karbonyyliä. Tällöin muodostuu dipeptidi, jonka kaava on

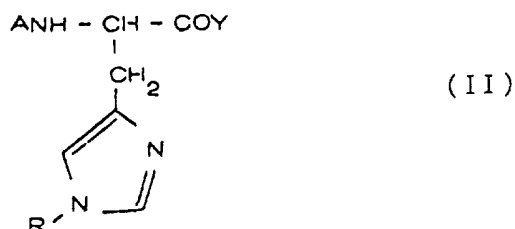


jossa ryhmä Y muunnetaan ryhmäksi, joka voi muodostaa dipeptidisidoksen, kuten hydroksiryhmäksi tai atsidoryhmäksi. Dipeptidi saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on

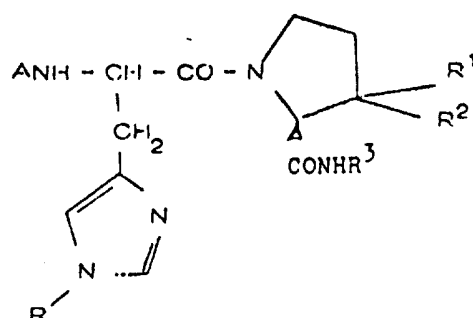


jossa R^1 , R^2 ja R^3 on edellä määritelty, minkä jälkeen suojaryhmä B mahdollisesti poistetaan. Liitännäreaktio, jossa mukana on karboksyyli-ryhmä, ts. reaktio kaavan III mukaisella yhdisteellä, jossa X on hydroksiryhmä, tai reaktio dipeptidin kanssa, jossa Y tarkoittaa hydroksiryhmää, suoritetaan liitännäaineen, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin läsnäollessa, edullisesti rasemisointi-inhibiittorin, kuten hydroksibentsotriatsolin, läsnäollessa.

(b) Histidiinijohdos, jonka kaava on



jossa R on edellä määritelty, A tarkoittaa sellaista N-suojaryhmää, jota yleensä käytetään dipeptidikemiassa (esimerkiksi t-butoksykarbonyyliä tai bentsoylylioksykarbonyyliä), ja Y tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen, kuten hydroksiryhmän, substituoidun fenoksiryhmän tai atsidoryhmän, liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on IV, jossa R^1 , R^2 ja R^3 on edellä määritelty. Tällöin muodostuu dipeptidi, jonka kaava on



jossa A, R, R¹, R² ja R³ on edellä määritelty. Suojaryhmä A poistetaan tämän jälkeen. Dipeptidi liitetään tämän jälkeen kaavan III mukaiseen yhdisteeseen, jossa X tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa dipeptidiseoksen, kuten hydroksiryhmän, substituoidun fenoksisryhmän, atsidoryhmän tai klooriatomin, ja B tarkoittaa vetyatomia tai suojaryhmää, kuten bentsyylioksi-karbonyyliä, minkä jälkeen suojaryhmä B mahdollisesti poistetaan. Liitännäreaktio, johon osallistuu karboksyyli-ryhmä, ts. kun X tai Y tarkoittaa hydroksiryhmää, suoritetaan liitännäaineen, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin, läsnäollessa, edullisesti rasemisointi-inhibiittorin, kuten hydroksibentsotriatsolin, läsnäollessa.

Kaavan IV mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa vastaavista alkyyli-substituoiduista proliineista suojaamalla iminofunktio esimerkiksi t-butoksikarbonyyli- tai bentsyylioksikarbonyyliryhmillä, aktivoimalla karbonyyliryhmä jollakin peptidikemian standardimenetelmällä (esimerkiksi seka-anhydridi- tai aktivoitu esteri-menetelmällä), liittämällä aktivoitu yhdiste ammoniakin tai amiinin kanssa sopivassa liuotuksessa ja poistamalla N-suojaryhmä peptidikemian standardimenetelmällä. Kaavan I mukaisilla yhdisteillä on voimakkaampi vaikutus reserpiinillä aiheutettuun hypotermiaan hiirillä kuin hormonilla TRH, eli L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-L-proliiniamidilla ja sen johdoksilla (sekundäärisillä amideilla), joita on kuvattu saksalaisessa hakemusjulkaisussa 2 343 035. Tämä selviää seuraavista koetuloksista. Kokeissa käytettiin menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa B.M, Askwe Life Sci., 10, 725 (1963). Koe-eläiminä käytettiin 8 koirashiiren MFI-OLA muodostamia ryhmiä. Koe-eläinten paino oli 18 - 22 g. Hiirille annettiin reserpiiniruiske vapaana emäksenä 3 mg per kg. Reserpiinin

aiheuttaman hypotermian annettiin kehittyä 17 - 18 tuntia lämpötilassa $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Lämpötila ruokatorvessa mitattiin oraalisesti asennetun anturin avulla ja osoitettiin digitaalisella lämpömittarilla. Kokeissa käytettiin ainoastaan sellaisia hiiriä, joiden lämpötila oli alennettu 25°C :een tai alle reserpiiniruiskeiden avulla.

Jokaiselle koe-eläinryhmälle annettiin joko suolaliuosta tai koeyhdistettä. Koe-eläimen lämpötila mitattiin ennen yhdisteiden antamista ja 0,5, 1, 2 ja 4 tuntia annostuksen jälkeen. Kaikki lämpötilamittaukset suoritettiin huoneessa, jonka lämpötila oli $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Näin saatiin lämpötilan kohoaminen ajan funktiona ja siitä piirretyn käyrän alla muodostunut pinta-ala laskettiin jokaiselle koe-eläimelle käyttäen Simpson-trapetsikaavaa. Keskimääräinen pinta-ala ($\pm$ standardipoikkeama) jokaisella hetkellä määrättiin ja saatuja tuloksia verrattiin vastaaviin vertailukoe-eläinten mittauksissa saatuihin tuloksiin. Laskettiin myös pienin vaikuttava annos suun kautta annettuna. Tämän lisäksi määrättiin suhteellinen vaikutus verrattuna TRH-aineen vaikutukseen vastaavissa kokeissa.

Saadut tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa, jossa TRH-sykloheksyyliamidi on kuvattu saksalaisen hakemusjulkaisun 2 343 035 esimerkissä 1.

Koeyhdiste	Pienin käytännössä vaikuttava annos, p.o., mg/kg	Suhteellinen vaikutus THR:n verrattuna	
		p.o.	i.v.
TRH	10	1	1
TRH-sykloheksyyliamidi	>15	-	-
Esimerkki 1	3	2,35 (1,6-3,3)	3,9 (2,1-7,4)
Esimerkki 3	<15	5,65 (3,8-10,0)	13,2 (6,7-26,2)
Esimerkki 4	1,5	16,90 (3,0-109)	31,8 (17,2-58,7)
Esimerkki 5	1,5	8,00 (3,5-19,8)	21,5 (6,9-67,2)
Esimerkki 7	<0,3	-	25,3 (15,8-40,4)

Terapeuttiset seokset voivat olla oraaliseen antamiseen tai parenteraaliseen antamiseen sopivassa muodossa. Tällaisia oraalisia seoksia voivat olla kapselit, tabletit, rakeet tai nestemäiset valmisteet, kuten eliksiirit, siirapit tai suspensiot.

Parenteraaliseen antamiseen aiottut seokset voivat olla steriileinä injektoitavina valmisteina, kuten liuoksina vedessä tai suolaliuoksessa.

Annostelun tarkkuuden kannalta on tarkoituksenmukaista, että seoksia käytetään yksikköannosmuodossa. Oraaliseen antamiseen tarkoitettu yksikköannos voi sisältää 1 - 100 mg kaavan I mukaista yhdistettä.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavilla ei-rajoittavilla esimerkeillä, joissa lämpötilat on annettu Celsiusasteina.

Esimerkki 1

L-pyroglutamyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidi
(I, R = H, R¹ = trans-3-CH₃, R² = R³ = R⁴ = H)

(a) N-t-butoksikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliini

Trietyyliamiinia (3,5 ml) ja t-butyli-2,4,5-trikloorifenyyli-karbonaattia (3,5 g) lisättiin liuokseen, joka sisälsi trans-3-metyyli-L-proliinia (1,25 g) t-butanolissa (12 ml) ja vedessä (8 ml). Seosta kuumennettiin 60⁰:ssa 2 tuntia, haihdutettiin, jäännös liuotettiin 1 N natriumbikarbonaattiliuokseen (50 ml) ja liuos pestiin eetterillä. Lisättiin ylimäärä kiinteää sitruunahappoa, tuote uutettiin etyyliasetaattiin, yhdistetyt uutteen kuivattiin (Na₂SO₄) ja haihdutettiin, jolloin saatiin raakaa kiteistä tuotetta (1,6 g). Kiteyttämällä uudelleen etyyliasetaatti/kevytpetrolista (40-60⁰) saatiin haluttua tuotetta (1,33 g), sp. 146-150⁰ /α_D²⁰ -60,1⁰ (c, 1,0, kloroformi)

(b) N-t-butoksikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidi

V-metyylimorfoliinia (6,0 ml) lisättiin N-t-butoksi-karbonyyli-

trans-3-metyyli-L-proliinin (1,1 g) liuokseen tetrahydrofuraanissa (50 ml) -20°C :ssa. Juuri tislattua isobutyliklooriformaattia (0,8 g) lisättiin tipottain ja liuosta sekoitettiin 10 minuuttia -20°C :ssa. Lisättiin väkevää ammoniakiliuosta (5 ml) ja liuosta sekoitettiin 2 tuntia, haihdutettiin, jäännös otettiin etyyliasettaattiin (100 ml) ja liuos pestiin 10-prosenttisella natriumbikarbonaatin vesiliuoksella, kyllästetyllä suolavedellä ja kuivattiin (Na_2SO_4). Haihduttamalla saatiin raakaa kiteistä tuotetta (1,0 g). Kiteyttämällä uudelleen etyyliasettaatti/kevytpetrolista ($40-60^{\circ}$) saatiin haluttua tuotetta (0,91 g) sp. $100-101^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} -79,7^{\circ}$ (c, 1,0, kloroformi)

(c) trans-3-metyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridi

Kloorivedyn liuos dioksaanissa (7,5 N, 5 ml) lisättiin liuokseen, joka sisälsi N-t-butoksikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidia (0,65 g) 10 ml:ssa dioksaania. 2 tunnin kuluttua erotettiin kiteinen kiinteä aine suodattamalla ja kiteytettiin uudelleen etanoli/eetteristä, jolloin saatiin tuotetta (0,47 g), sp. $235-237^{\circ}$ $[\alpha]_D^{20} -14,8^{\circ}$ (c, 1,0, vesi)

(d) L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidi

trans-3-metyyli-L-proliiniamidi-hydrokloridia (0,50 g) dimetyyli-formamidissa (5 ml) liuokseen, joka sisälsi 5,2 g N-bentsyylioksi-karbonyyli-L-pyroglutamiinihappoa ja 20 ml asetonitriiliä, lisättiin liuokseen, joka sisälsi 3,38 g L-histidiini-metyyliesteriä ja 10 ml asetonitriiliä, ja saatu seos jäähdytettiin lämpötilaan -10°C . Saatu sakka liuotettiin lisäämällä pieni määrä dimetyyli-formamidia. Tämän jälkeen lisättiin 4,12 g disykloheksyylikarbodi-imidiä. Seos pidettiin lämpötilassa -10°C tunnin ajan, minkä jälkeen seoksen lämpötila sai nousta huoneen lämpötilaan yön aikana. Seos suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin metyleenikloridiin, saatu liuos pestiin 0,5 M boorihapolla, 10-prosenttisella natriumbikarbonaattiliuoksella ja kyllästetyllä suolaliuoksella, minkä jälkeen se kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Saatu jäännös uudelleenkiteytettiin metanolin ja dietyylieetterin seoksesta,

jolloin saatiin N-bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyli-L-histidyyli-metyyliesteriä. Esteri liuotettiin metanoliin ja hydrattiin palladiumia ja hiiltä sisältävän katalysaattorin läsnäollessa. Katalysaattori poistettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jäännös uudelleenkiteytettiin metanolin ja dietyylieetterin seoksesta, jolloin saatiin L-pyroglutamyli-L-histidyyli-metyyliesteriä. Suojaryhmästä vapautettuun esteriin (2,8 g) 20 ml:ssa metanolia, lisättiin 2 ml hydratsiinihydraattia lämpötilassa -10°C . Seos sai seistä yön yli ja sakka otettiin talteen ja pestiin metanolilla ja dietyylieetterillä, kuivattiin ja uudelleenkiteytettiin vesipitoisesta etanolista.

Näin saatua L-pyroglutamyli-L-histidiini-atsidia sisältävään liuokseen dimetyyliformamidissa (15 ml) lisättiin -20°C :ssa trietyyliamiinia (0,45 ml). Seoksen annettiin seistä huoneen lämpötilassa 12 tuntia, suodatettiin, haihdutettiin ja jäännös liuotettiin 1-prosenttiseen vesipitoiseen pyridiiniin (10 ml) ja vietiin pylvääseen, joka sisälsi sulfoetyyli "Sephadex" C-25 hartsia (50 g punnittuna märkänä hartsinä; pylvään halkaisija 2 cm), joka oli tasapainoitettu 1-prosenttisen vesipitoisen pyridiinin kanssa.

Pylväs eluoitiin gradienttitekniikalla käyttämällä 5-prosenttista vesipitoista pyridiiniä 1 litran pyöreän sekoitusastian kautta, joka oli täytetty 1-prosenttisellä vesipitoisella pyridiinillä. Tuotetta sisältävät jakeet (määritys optisen rotaation ja ohutlevykromatografian avulla) yhdistettiin, haihdutettiin ja jäännös jauhettiin eetterin kanssa, jolloin saatiin tuote (monohydraattina) amorfisena kiinteänä aineena (0,70 g).

$[\alpha]_D^{20} -46,7^{\circ}$ (c, 1,0, vesi). R_F 3B 0,48, sp. 145-148 $^{\circ}$

Analyysi

Saatu C, 42,5 : H, 7,0 : N, 21,3

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4$, H_2O laskeutu

C, 51,8 : H, 6,7 : N, 21,3 %

Esimerkki 2

L-pyroglutamyli-L-histidyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi

62823

(a) trans-3-etyyli-dl-proliini

Dibentsyylioksikarbonyyliamino-malonaattia (11,5 g, 38 millimoolia) liuotettiin kuivaan etanoliin (50 ml) ja lisättiin natriumin (150 mg) liuokseen kuivassa etanolissa (10 ml). Sekoitettuun liuokseen lisättiin tipottain pent-2-enaalia (3,2 g, 38 millimoolia) etanolissa (10 ml) ja liuosta sekoitettiin 1 tunti. Sen jälkeen lisättiin etikkahapon (0,29 ml) liuos etanolissa (1 ml) ja liuos hydrattiin 2 tunnin ajan ilmakehän paineessa käyttämällä katalyyttinä palladium/hiiltä (5 %). Katalyytti erotettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin kloroformiin ja liuos pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella, joka sisälsi hieman natriumbikarbonaattia, kuivattiin (Na_2SO_4) ja haihdutettiin. Tislaamalla jäännös paineessa 15 mm Hg saatiin 4-etyyli-5,5-dikarboetoksi-2-pyrroliinia (5,65 g) värittömänä öljynä, kp. 115-120° (15 mm Hg) IR 1715, 1610 cm^{-1} .

Pyrroliini (4,68 g, 19,5 millimoolia) lisättiin seokseen, joka sisälsi 1M natriumhydroksidia (80 ml) ja etanolia (80 ml), ja liuosta sekoitettiin 4 tuntia 50°:ssa. Sen jälkeen liuos jäähdytettiin, lisättiin natriumboorihydraattia (1,0 g) ja sekoitettiin vielä 10 tuntia 25°:ssa. Sen jälkeen liuos tehtiin varovasti happameksi laimealla suolahapolla pH-arvoon 4, väkevöitiin ja vietiin Dowex 50WX8 hartsia (H^+ muoto, 100 ml) sisältävään pylvääseen. Eluoimalla vesipitoisella ammoniakilla (2 M) saatiin liuos, josta haihdutettaessa saatiin trans-3-etyyli-dl-proliinia (2,1 g), sp. 208-209°; R_F 3B 0,43. Analysoitaessa Jeol 6AH amino-happoanalysaattorilla (50 cm pylväs, natriumsitraattipuskuri 0,2 N, pH 3,25, lämpötila 57°) saatiin yksi ainoa piikki (eluointiaika 117 minuuttia).

(b) t-butylioksikarbonyyli-trans-3-etyyli-dl-proliini

Tämä valmistettiin trans-3-etyyli-dl-proliinista (1,72 g) esimerkin 1(a) menetelmällä öljynä (2,82 g). R_F 3A 0,92.

(c) t-butylioksikarbonyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 1(b) mukaisella menetelmällä t-

butyylioksidikarbonyyli-trans-3-etyyli-dl-proliinista (3,5 g). Silikageelipylvässä suoritettun kromatografisen käsittelyn jälkeen saatiin t-butylioksidikarbonyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidia (3,1 g) valkoisina kiteinä, sp. 78-80°;

(d) trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi-hydrokloridi

Tämä valmistettiin esimerkin 1(c) menetelmällä t-butylioksidikarbonyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidista (3,0 g), jolloin saatiin trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi-hydrokloridia (1,5 g) valkoisina kiteinä, sp. 206-207° R_F 3A 0,22 R_F 3B 0,72.

(e) trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi

Trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi-hydrokloridia (0,5 g) liuotettiin veteen ja johdettiin DEAE-Sephadex-hartsia (OH⁻ muoto) sisältävän pylvään läpi. Tuotetta sisältävät jakeet (määritys ohutlevykromatografian avulla) yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi-hydraattia (0,45 g) valkoisena kiinteänä aineena, sp. 89,5-91° R_F 3A 0,22 R_F 3B 0,72.

(f) L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidi

1,36 g disykloheksyylikarbodi-imidiä lisättiin N-bentsyylioksidikarbonyyli-L-pyroglutamiinihapon (1,58 g) ja N-hydroksisukkinimidin (0,76 g) ja dimetoksietaanin jäähdytettyn liuokseen, saatua liuosta sekoitettiin 18 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos suodatettiin ja suodatettu aines pestiin dimetoksietaanilla. Suodos ja pesuliuokset haihdutettiin kuiviin ja näin saatu jäännös kiteytettiin isopropanolista. Saatu aktiiviesteri (1,35 g) liuotettuna 2,5 ml:aan dioksaania, lisättiin L-histidiinin natriumsuolaliuokseen (liuos oli valmistettu 0,64 g:sta L-histidiiniä ja 0,51 g:sta Na₂CO₃·5H₂O 5 ml:ssa vettä). Seosta sekoitettiin 4 tuntia ja väkevöitiin alennetussa paineessa pieneen tilavuuteen, minkä jälkeen väkevöity liuos neutraloitiin laimennetulla suolahapolla ja väkevöitiin edelleen noin 2 ml:n tilavuuteen. Saatu kiinteä aines kerättiin ja otettiin talteen, pestiin jäävedellä ja uudelleenkiteytettiin 30-prosenttisesta metanolivesiliuoksesta.

Näin valmistettua N-bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L-histidiinia (822 mg, 2 millimoolia, trans-3-etyyli-dl-proliiniamidia (288 mg, 2 millimoolia) ja hydroksibentsotriatsolia (550 mg, 4 millimoolia) liuotettiin dimetyyliformamidiin (6 ml), liuos jäähdytettiin 0°C:een, lisättiin disykloheksyylikarbodi-imidiä (480 mg, 2,2 millimoolia) ja seosta sekoitettiin 18 tuntia. Sen jälkeen seos suodatettiin ja suodos haihdutettiin. Saatu öljy liuotettiin tetrahydrofuraani-veteen (1:1, 80 ml), lisättiin palladium/hiiltä (10 %, 60 mg) ja liuos hydrattiin 4 tunnin aikana ilmakehän paineessa. Sen jälkeen katalyytti poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin. Saatu kumimainen aine jaettiin etyyliasetaatin (50 ml) ja veden (80 ml) kesken. Vesifaasi erotettiin, haihdutettiin kuiviin ja jäännös liuotettiin vesiliuokseen, joka sisälsi 1 % etikkahappo/0,05 % pyridiiniä. Tämä vietiin S.P. - Sephadex C 25 hartsia (pyridinium-muoto) sisältävään pylvääseen, jolloin hartsi oli tasapainoitettu vesipitoisen 1 % etikkahappo/0,05 % pyridiinin kanssa. Pylväs eluoitiin gradienttitekniikalla käyttämällä 1 % etikkahappo/1 % pyridiiniä 500 ml pyöreän sekoitusastian kautta, joka oli täytetty vesipitoisella 1 % etikkahappo/0,05 % pyridiinillä. Tuotetta sisältävät jakeet (määritettiin ohutlevykromatografian avulla) yhdistettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-etyyli-dl-proliiniamidia (205 mg) valkoisena amorfisena kiinteänä aineena, sp. 156-160°. R_F 3A 0,27, R_F 3B 0,50. Happamen hydrolyysin jälkeen saatiin aminohappoanalyyseissä seuraavat suhteet: Histidiini 0,95 g glutamiinihappo 0,99 3-etyyliproliini 1,06.

Esimerkki 3

L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi

(a) 3,3-dimetyyli-dl-proliini

Dietyyli-bentsyylioksikarbonyyliaminomalonaattia (3,09 g, 10 millimoolia) liuotettiin kuivaan etanoliin (15 ml) ja lisättiin liuokseen, joka sisälsi natriumetoksidia (valmistettu 100 mg:sta natriumia) etanolissa (3 ml). Lisättiin 3-metyyli-but-2-enaalia (840 mg, 10 millimoolia) etanolissa (6 ml) ja liuosta sekoitettiin 24 tuntia 25°:ssa. Sen jälkeen lisättiin etikkahappoa (0,18

ml) ja liuos hydrattiin 24 tunnin aikana käyttämällä katalyyttinä palladium/hiiltä (10 %, 500 mg). Liuos suodatettiin, haihdutettiin ja jäännös käsiteltiin kromatografisesti silikageelipylväässä käyttämällä eluointiaineena eetteri/petrolieetteriä (40-60°) (1:1), jolloin saatiin 2,2-dikarboetoksi-3,3-dimetyyli-pyrrolidiinia (0,9 g).

Tätä diesteriä (850 mg) refluksoitettiin 4 tuntia 5 M suolahapossa (10 ml), josta haihduttamisen jälkeen saatiin jauhemaista kiinteää ainetta. Kiteyttämällä uudelleen metanoli/eetteristä saatiin 3,3-dimetyyli-dl-proliini-hydrokloridia (451 mg) valkoisina kiteinä, sp. 110-112°.

(b) t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliini

Tämä valmistettiin esimerkin 1(a) mukaisella menetelmällä 3,3-dimetyyli-dl-proliini-hydrokloridista (1,07 g), jolloin saatiin t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliinia (1,45 g) valkoisena kiteisenä aineena, sp. 107-108,5°.

(c) t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 1(b) mukaisella menetelmällä t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliinista (900 mg), jolloin saatiin t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidia (375 mg) valkoisena kiteisenä kiinteänä aineena, sp. 115-117°.

(d) 3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi-hydrokloridi

Tämä valmistettiin esimerkin 1(c) mukaisella menetelmällä t-butylioksikarbonyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidista (300 mg), jolloin saatiin 3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi-hydrokloridia (175 mg) valkoisena kiteisenä aineena, sp. 220-223°.

(e) 3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 2(e) mukaisella menetelmällä hydrokloridisuolasta (170 mg) valkoisena kiinteänä aineena (135 mg)

62823

R_F 3A 0,19 R_F 3B 0,70.

(f) L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 2(f) menetelmällä 3,3-dimetyyli-dl-proliiniamidista (100 mg) valkoisena jauheena (195 mg), sp. 180° (pehmenemispiste 135°) R_F 3B 0,65. Happohydrolyysin jälkeen aminohappoanalyysi antoi seuraavat suhteet: Histidiini 1,02, glutamiinihappo 0,89, 3,3-dimetyyliproliini 1,02 $[\alpha]_D^{22} + 5,9^\circ$ (c = 1, dimetyyliformamidi).

Esimerkki 4

L-pyroglutamyyli-N-metyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidi

(a) Bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-N-metyyli-L-histidiini

N-metyyli-L-histidiiniä (428 mg) ja natriumkarbonaattia (288 mg) liuotettiin veteen (5 ml) ja liuoksen pH säädettiin arvoon 8,5. Lisättiin bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamiinihapon N-hydroksisukkinimidoesteriä (933 mg) dioksaanissa (5 ml) ja liuosta sekoitettiin 22° :ssa 15 tuntia. Liuos haihdutettiin ja jäännös käsiteltiin kromatografisesti silikageelipylvässä (15 x 330 mm) käyttämällä eluointiainena isopropyyli-etyyliasetatti-etikkahappo-vettä (3:1:1:1), jolloin sopivan jakeen haihduttamisen jälkeen saatiin tuote (615 mg) valkoisena kiinteänä aineena, sp. $192-195^\circ$ R_F 3A 0,21 R_F 3B 0,69 $[\alpha]_D^{22} -1,3^\circ$ (c = 1, dimetyyliformamidi).

(b) L-pyroglutamyyli-N-metyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliiniamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 2(f) menetelmällä bentsyylioksikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-N-metyyli-L-histidiinistä (207 mg) ja trans-3-metyyli-L-proliiniamidista (77 mg), jolloin saatiin valkoista hygroskooppista kiinteää ainetta (90 mg) R_F 3A, sp. $135-140^\circ$ R_F 3B 0,60

(Saatu C, 55,0; H, 7,0; N, 21,2; $C_{18}H_{23}N_6O_4$ laskettu C, 55,4; H, 6,7; N, 21,5 %) $[\alpha]_D^{22} = 23,9^\circ$ (c = 1, dimetyyliformamidi).

Esimerkki 5

L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi

(a) t-butylioksidikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 1(b) menetelmällä t-butylioksidikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliinista (1,15 g) ja sykloheksyyliamiinista (2,85 ml) valkoisena kiinteänä aineena (1,3 g), sp. 130-134° R_F 1F 0,53.

(b) trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi

Tämä valmistettiin esimerkkien 1(c) ja 1(d) menetelmällä t-butylioksidikarbonyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidista (900 mg) valkoisena kiinteänä aineena (410 mg) sp. 111-113° R_F 2A 0,33.

(c) L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi

Tämä valmistettiin esimerkin 2(d) menetelmällä bentsoylioksidikarbonyyli L-pyroglutamyyli-L-histidiinistä (565 mg) ja trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidista (300 mg) valkoisena kiinteänä aineena (272 mg), sp. 145-150°. R_F 3A 0,43 R_F 3B 0,78 $[\alpha]_D^{22} = 14,9^\circ$ (c = 1, dimetyyliformamidi) R_F 4A 0,50.

Esimerkki 6

L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi

(a) N^α -t-butylioksidikarbonyyli- N^{im} -2,4-dinitrofenyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi.

1,18 g (2,8 mM) N^{α} -t-butylioksikarbonyyli- N^{im} -2,4-dinitrofenyyli-L-histidiiniä, 590 mg (2,8 mM) trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidia ja 496 mg (2,8 mM) N-hydroksi-5-norborneeni-2,3-dikarboksi-imidiä liuotettiin kuivaan dimetyyliformamidiin, saatu liuos jäähdytettiin sekoittaen lämpötilaan -10° . Tämän jälkeen lisättiin 639 mg (3,1 mM) N,N^1 -disykloheksyylikarbodi-imidiä 2 ml:ssa dimetyyliformamidia, saatu liuos sekoitettiin huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Tämän jälkeen lisättiin vielä 60 mg N^{α} -t-butylioksikarbonyyli- N^{im} -2,4-dinitrofenyyli-L-histidiiniä ja 35 mg N,N^1 -disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 3 tunnin jälkeen suodatettiin liuos ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin 50 ml:aan etyyliasetaattia, minkä jälkeen saatu liuos uutettiin kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella (2 x 50 ml), kuivattiin ja haihdutettiin kuiviin. Epäpuhdas aines puhdistettiin kromatografisesti silikageelikolonnissa (45 x 2,5 cm). Aines eluoitiin etyyliasetaatin, etikkahapon, pyridiinin ja veden liuoksella 1920:6:20:11. Toivottua tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Näin saatiin 900 mg (saanto 52 %) puhdasta suojattua dipeptidiä keltaisena kiinteänä aineena, jonka sulamispiste oli $103-108^{\circ}$. $R_F 3A$ 0,91; $R_F 7C$ 0,78.

(b) N^{im} -2,4-dinitrofenyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi-dihydrokloridi.

600 mg vaiheessa (a) saatua suojattua dipeptidiä liuotettiin 10 ml:aan kloorivedyn etikkahappoa (1 ml, 2,63 M). Liuosta lisättiin ja saatua liuosta sekoitettiin 2 tuntia lämpötilassa 22° , liuos laimennettiin tämän jälkeen 100 ml:lla kuivaa eetteriä ja 20 ml:lla metanolia. Saatu liuos haihdutettiin kuiviin ja jäännös kuivattiin suurtyhjöllä. Näin saatiin 50 mg (88 %) toivottua dihydrokloridia keltaruskeana kiinteänä aineena.

$[\alpha]_{578}^{20} = +2,1^{\circ}$ (c = 1; DMF); $R_F 3A$ 0,39; $R_F 4A$ 0,72; $R_F 7B$ 0,29.

(c) L-pyroglutamyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisykloheksyyliamidi.

130 mg (1 mM) L-pyroglutamiinihappoa, 583 mg (1 mM) N^{im} -2,4-dinitrofenyyli-L-histidyyli-trans-3-metyyli-L-proliinisyklo-

heksyyliamidi-dihydrokloridia, 177 mg (1 mM) N-hydroksi-5-nor-borneeni-2,3-dikarboksi-imidiä ja 303 mg (3 mM) N-metyylimorfoliinia liuotettiin 20 ml:aan dimetyyliformamidia ja saatua liuosta jäähdytettiin 0°:een. Seokseen lisättiin 227 mg (1,1 mM) N,N¹-disykloheksyylikarbodi-imidiä ja saatua seosta sekoitettiin lämpötilassa 22° 18 tuntia. Reaktioseos suodatettiin ja suodos haihdutettiin. Jäännös liuotettiin 15 ml:aan dimetyyliformamidia, minkä jälkeen 1 ml tioetanolia lisättiin. 2 tunnin jälkeen liuos haihdutettiin, jäännös liuotettiin 2 ml:aan dimetyyliformamidin ja veden seosta (tilavuussuhteet 99:5). Saatua liuos johdettiin SP-Sephadex[®]-kolonniin OH⁻-muodossa (2 x 10 cm). Kun neutraali jae oli pesty ulos kolonnista, muutettiin eluointiaine dimetyyli-formamidin, veden ja trietyyliamiinin seokseksi (tilavuussuhteet 37:3:1), jolloin emäksiset komponentit eluoitiin. Toivottua tuotetta sisältävät jakeet kerättiin talteen ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin 5 ml:aan etanolia, saatua liuos johdettiin SP-Sephadex[®]-kolonniin pyridinium-muodossa (13 x 30 cm). Suoritettiin gradientti eluointi 1 % vettä sisältävästä pyridiinistä 5 % vettä sisältävään pyridiiniin, jolloin käytettiin sekoituskammiota, jonka tilavuus oli 500 ml. Toivottua tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin. Jäännös lyofilisoiitiin vedessä, jolloin saatiin 200 mg toivottua tripeptidiä kermanvärisenä kiinteänä aineena. $[\alpha]_D^{20} = -13,6^\circ$ (c = 1, DMF). Kromatografinen analyysi osoitti, että tuote oli sama kuin esimerkissä 5 valmistettu.

Esimerkki 7

L-pyroglutamyli-L-histidyyli-3,3-dimetyyli-L-proliiniamidi

(a) 3,3-dimetyyli-L-proliiniamidi

Yhdiste valmistettiin jakamalla raseeminen amidi käyttämällä (-)viinihappoa metanolissa. Saostettu tartraattisuola uudelleen-kiteytettiin kolme kertaa metanolista. Kun viinihappo oli poistettu Amberlite[®] IRA-400-ioninvaihtokromatograafisesti, saatiin toivottu L-isomeeri puhtaana. $[\alpha]_D^{20} = +39^\circ$ (c = 1, 0,1 M HCl); R_F3A 0,14; R_F4A 0,46.

(b) L-pyroglutamyli-L-histidyyli-3,3-dimetyyli-L-proliiniamidi

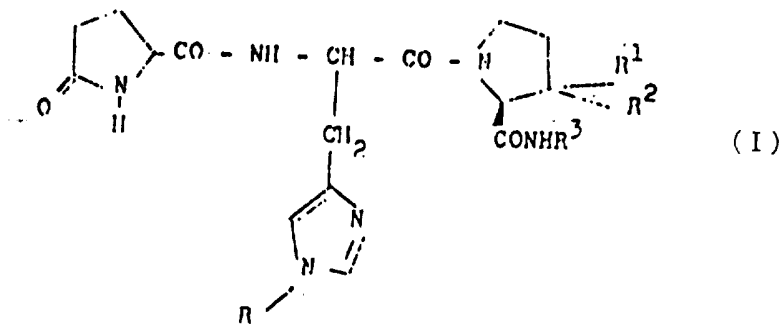
401 mg (1 mM) N-bentsyylioksidikarbonyyli-L-pyroglutamyyli-L-histidiiniä, 142 mg (1 mM) 3,3-dimetyyli-L-proliiniamidia ja 117 mg (1 mM) N-hydroksi-5-norborneeni-2,3-dikarboksi-imidiä liuotettiin dimetyyliformamidiin. Saatu liuos jäädytettiin lämpötilaan 0°, minkä jälkeen 227 mg (1,1 mM) N,N¹-disykloheksyylikarbodi-imidiä lisättiin. Näin saatua liuosta sekoitettiin 48 tuntia, jolloin muodostunut N,N¹-disykloheksyylikarbamidi erotettiin suodattamalla. Suodos haihdutettiin ja jäännös liuotettiin 60 ml:aan tetrahydrofuraanin ja veden liuosta (samat tilavuusosat). Lisättiin palladiumia ja hiiltä (100 mg, 10 %), ja vetyä johdettiin suspensioon sekoittaen 12 tuntia. Katalyysaattori poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin. Epäpuhtas tuote puhdistettiin Sephadex[®] G25 (3 x 80 cm)-kromatografisesti, jolloin käytettiin n-butanolin, etikkahapon ja veden liuosta tilavuussuhteissa 4:1:5. Epäpuhtas tuote liuotettiin ylempään faasiin (10 ml) ja johdettiin kolonniin, joka ensin oli saatettu tasapainoon ensiksi alemman ja tämän jälkeen ylemmän faasin kanssa. Kerättiin 300 pisaraa käsittäviä jakeita ja ne jakeet, jotka sisälsivät toivottua tuotetta, yhdistettiin ja haihdutettiin. Jäännös lyofilisoitiin vedessä, jolloin saatiin 130 mg L-pyroglutamyyli-L-histidyyli-3,3-dimetyyli-L-proliiniamidia valkoisena kiinteänä aineena, jonka sulamispiste on 163-166°. R_F3A 0,10; R_F3B 0,45; R_F4A 0,26.

Edellä olevissa esimerkeissä suoritettiin ohutlevykromatografia Kieselgel GF₂₅₄ levyillä käyttämällä seuraavia liuotinsysteemejä:

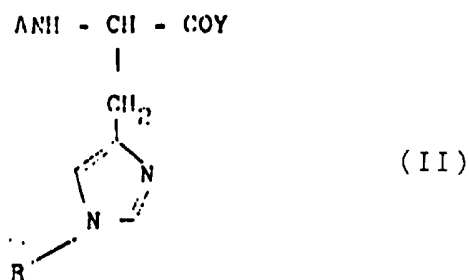
- 1E metanoli, kloroformi 1:4
- 1F metanoli, kloroformi 1:9
- 2A kloroformi, metanoli, etikkahappo 18:2:1
- 3A kloroformi, metanoli, etikkahappo, vesi 80:18:2:3
- 3B kloroformi, metanoli, etikkahappo, vesi 30:20:4:6
- 4A n-butanoli, etyyliasetaatti, etikkahappo, vesi 1:1:1:1
- 6C n-butanoli, pyridiini, etikkahappo, vesi 30:20:6:12
- 7C etyyliasetaatti, pyridiini, etikkahappo, vesi 120:20:6:11.

Patenttivaatimus

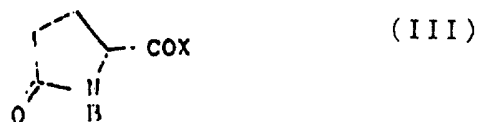
Menetelmä valmistaa terapeuttisesti vaikuttavia histidiinijohdoksia, joiden yleiskaava I on



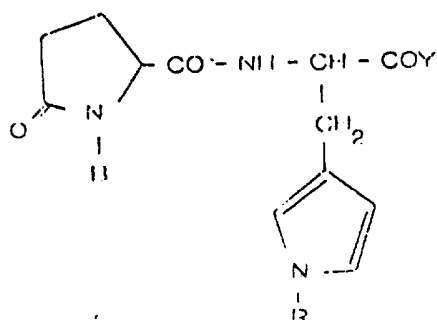
jossa R on vety tai 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä; R^1 on 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä; R^2 on vety tai 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä; R^3 on vety tai sykloheksyyli-ryhmä, t u n n e t t u siitä, että (a) histidiinijohdos, jonka kaava on



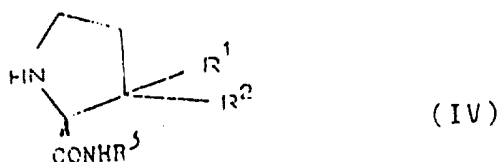
jossa R on edellä määriteltä, Y tarkoittaa suojaryhmää ja A tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen, liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on



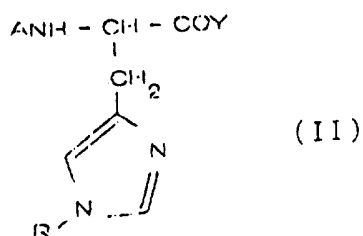
jossa B tarkoittaa vetyatomia tai suojaryhmää ja X tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen, dipeptidin muodostamiseksi, jonka kaava on



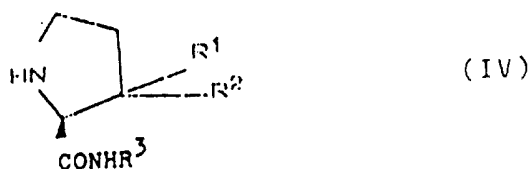
jossa B, Y ja R on edellä määritelty, minkä jälkeen suojaryhmä Y muunnetaan ryhmäksi, joka voi muodostaa peptidisidoksen ja dipeptidi liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on



jossa R^1 , R^2 ja R^3 on edellä määritelty, minkä jälkeen suojaryhmä B mahdollisesti poistetaan, tai (b) histidiinijohdos, jonka kaava on

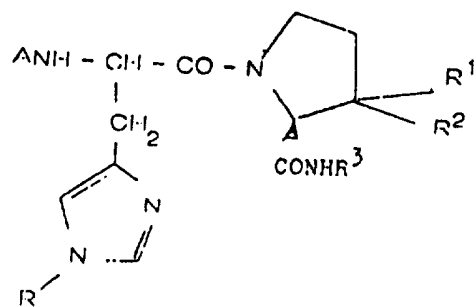


jossa R on edellä määritelty, A tarkoittaa N-suojaaavaa ryhmää, ja Y tarkoittaa ryhmää, joka voi muodostaa peptidisidoksen, liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on

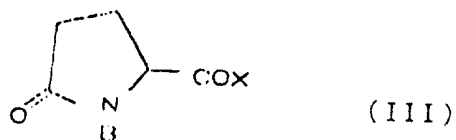


jossa R^1 , R^2 ja R^3 on edellä määritelty, dipeptidin muodostamiseksi, jonka kaava on

62823



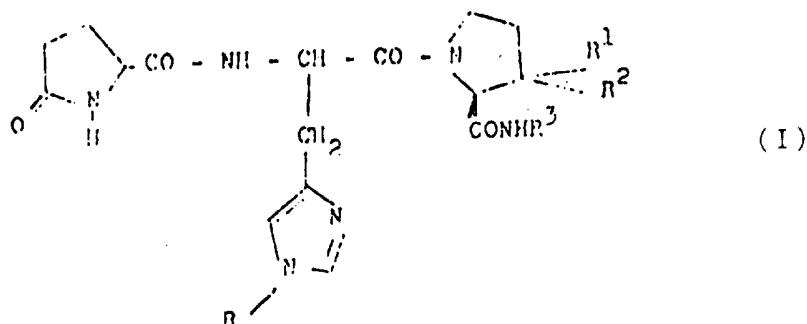
jossa A, R, R¹, R² ja R³ on edellä määritelty, minkä jälkeen suojaryhmä A poistetaan ja dipeptidi liitetään yhdisteeseen, jonka kaava on



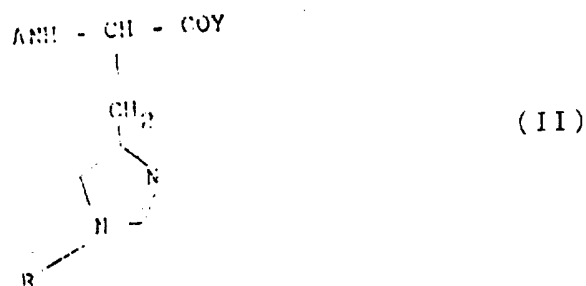
jossa B on vetyatomi tai suojaryhmä ja X on ryhmä, joka voi muodostaa peptidisidoksen, minkä jälkeen suojaryhmä B mahdollisesti poistetaan.

Patentkrav

Förfarande för framställning av histidinderivat med den allmänna formeln



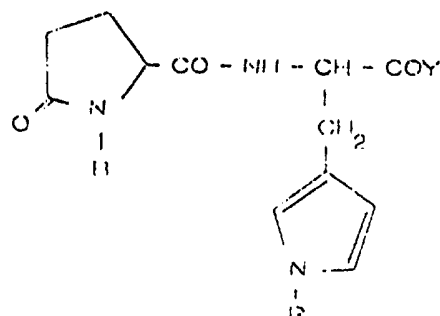
där R betecknar en väteatom eller en alkylgrupp innehållande 1-3 kolatomer, R^1 betecknar en alkylgrupp innehållande 1-3 kolatomer, R^2 betecknar en väteatom eller en alkylgrupp innehållande 1-3 kolatomer, och R^3 betecknar en väteatom eller en cyklohexylgrupp, k ä n n e t e c k n a t av att (a) ett histidinderivat med formeln



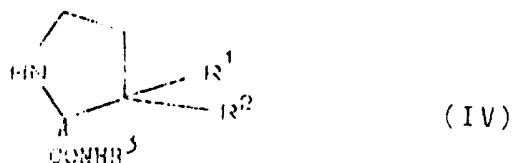
där R har ovan angivna betydelse, Y betecknar en skyddsgrupp och A betecknar en grupp som kan bilda en peptidbindning, kopplas med en förening med formeln



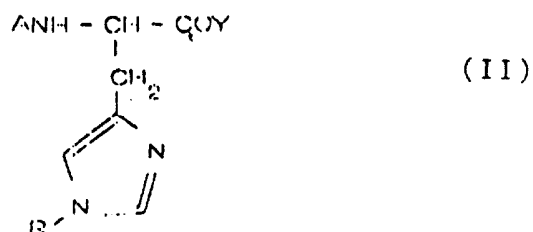
där B betecknar en väteatom eller en skyddsgrupp och X betecknar en grupp som kan bilda en peptidbindning, till bildning av en dipeptid med formeln



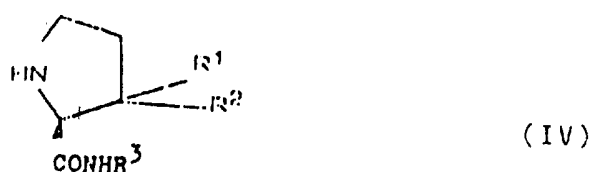
där B, Y och R har ovan angivna betydelser, varefter skyddsgruppen Y omvandlas till en grupp som kan bilda en peptidbindning och dipeptiden kopplas med en förening med formeln



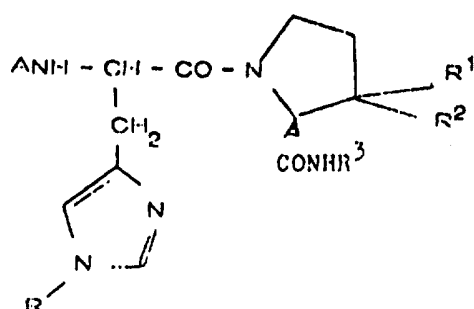
där R¹, R² och R³ har ovan angivna betydelser, varefter en eventuell skyddsgrupp B avlägsnas; eller att (b) ett histidinderivat med formeln



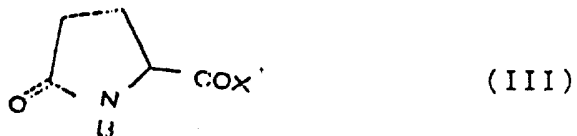
där R har ovan angivna betydelse, A betecknar en N-skyddande grupp, och Y betecknar en grupp som kan bilda en peptidbindning, kopplas med en förening med formeln



där R¹, R² och R³ har ovan angivna betydelser, till bildning av dipeptid med formeln



där A, R, R¹, R² och R³ har ovan angivna betydelser, varefter skyddsgruppen A avlägsnas och dipeptiden kopplas med en förening med formeln



där B betecknar en väteatom eller en skyddsgrupp och X betecknar en grupp som kan bilda en peptidbindning, varefter en eventuell skyddsgrupp B avlägsnas.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 343 035, 2 416 428 (C 07 c 103/52), 2 406 543 (C 07 d 49/36).