

1939/94

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



69700

59.279/DE

Kivonat

Szintetikus aglükodalbaheptid antibiotikumok

GRUPPO LEPETIT S.p.A., LAINATE (MI), OLASZORSZÁG

A bejelentés napja: 1994. 04. 14.

Elsőbbsége: 1993. 05. 19. (93108139.2), *Italy*

~~NAGY-BRITANNIA~~

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/01154

A nemzetközi közzététel száma: WO 94 / 200 80

A találmány (I) általános képletű szintetikus aglükodalbaheptidekre, a képletben

W és Z egymástól függetlenül a dalbaheptid csoportba tartozó

valamely antibiotikum aglikonjának relatív része;

Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R és R₁ egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az aminocsoportot védő csoport;

R₂ hidrogénatom,

és savval vagy bázissal képezett sóikra, valamint belső sóikra,

az (I) általános képletű aglükodalbaheptidek előállítási eljárására és gyógyszerként való alkalmazására vonatkozik.

Gwala

rell, 8 rez

jell. ábrák (I)

33833

A

- 59.279/DE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

1939 / 94 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NS206 C 07 K 7 / 06
A 61 K 38 / 08

Szintetikus aglükodalbaheptid antibiotikumok

GRUPPO LEPETIT S.p.A., LAINATE (MI), OLASZORSZÁG

Feltalálók: MALABARBA Adriano, VINASCO (MI),
CIABATTI Romeo, NOVATE MILANESE (MI),
OLASZORSZÁG

A bejelentés napja: 1994. 04. 14.

Elsőbbsége: 1993. 05. 19. (93108139.2), ~~Malabarba~~

~~NAGY-BRITANNIA~~

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/01154

A nemzetközi közzététel száma: WO 94 / 207 80



A jelen találmány (I) általános képletű, szintetikus aglükodalbaheptidekre vonatkozik, a képletben

W és Z egymástól függetlenül a dalbaheptid csoportba tartozó valamely antibiotikum aglikonjának (aglükodalbaheptidek) relatív része;

Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R és R₁ egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az aminocsoportot védő csoport;

R₂ hidrogénatom.

A találmány magában foglalja a fentebb bemutatott szintetikus aglükodalbaheptidek savakkal vagy bázisokkal képezett valamint belső sóit is.

A találmány egy további tárgya eljárás (I) általános képletű aglükodalbaheptid antibiotikumok előállítására a (II) általános képletű tetrapeptidekből kiindulva, a képletben

W és Z egymástól függetlenül a dalbaheptid csoportba tartozó antibiotikum aglikonjának (aglükodalbaheptidek) relatív része;

Y karboxilcsoport vagy egy, a karboxilcsoport egy funkciós származéka;

R₃ és R₄ egymástól függetlenül aminocsoport vagy védett aminocsoport; és

R₅ hidrogénatom vagy egy, a karboxilcsoportot védő csoport.

A (II) általános képletű tetrapeptideket, sóikat és az



előállításukra alkalmas eljárást a W092/10517 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben írják le. A fenti nemzetközi bejelentés kimerítő leírást ad a természetben előforduló dalbaheptid antibiotikumokról és négy alcsoportba való osztályozásukról, amely szerint risztocetin-, vankomicin-, avoparcin- és szünmonicin-típusú dalbaheptideket különböztetnek meg.

Azokat a pentapeptid prekurzorokat, amelyek a fenti tetrapeptidek előállítására alkalmasak, a 409 045 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben írják le.

A dalbaheptidek megjelölés általában minden olyan antibiotikus anyagot magában foglal, amelyekben közös, hogy nagy mértékben módosított, lineáris heptapeptid szerkezettel rendelkeznek, amely hét aminosavból épül fel, és ezek közül öt állandóan aril- és aril-metil-aminosav. A fenti szerkezet meghatározó a hasonló hatásmechanizmus szempontjából, azaz a peptidek a sejtfalszintézis egy vagy több közbenső termékének a D-alanil-D-alanin végével specifikus komplexet képeznek, ami a sejt szétbomlásához vezet (ld. még F. Parenti és B. Cavalleri, "Novel glycopeptide antibiotics of the dalbaheptide group", *Drugs of the future*, 15(1):57-72, (1990) és B. Cavalleri, F. Parenti: "Glycopeptides (dalbaheptides)", a *Kirk-Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology* című műben, 2. kötet, 995-1018. oldal, J. Wiley & Sons, 1992).

A jelen találmány egy előnyös megvalósításának megfelelően az (I) általános képletű szintetikus aglükodalbahepti-



dek azokat a származékokat foglalják magukban, amelyekben W (a) általános képletű csoportot és Z (b) általános képletű csoportot jelent, a képletekben

i):

A hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxilcsoportot védő csoport;

R_6 , R_7 és R_8 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy halogénatom, ahol a halogénatom előnyösen klór- vagy brómatom, és legelőnyösebben az éterkötéshez képest orto-helyzetben van;

R_9 és R_{10} egymástól függetlenül hidrogénatom vagy OR_{15} általános képletű csoport, amelyben R_{15} hidrogénatom vagy egy, a benziles hidroxilcsoportot védő csoport.

Amint az az (I) általános képletben látható, a W csoport egyidejűleg kapcsolódik az aglükodalbaheptidek heptapeptid-láncában (jobbról kezdve) a második, negyedik és hatodik aminosavrészhez;

ii): az OR_{11} és OR_{12} általános képletű csoportok előnyösen a két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez viszonyítva para- és orto-helyzetben vannak, és az

R_{11} és R_{12} csoport egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxilcsoportot védő csoport;

az OR_{13} általános képletű csoport előnyösen a két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez képest orto-helyzetben van és az R_{13} csoport hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxilcsoportot védő csoport;

az R_{14} csoport előnyösen a két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez képest meta-helyzetű és hidrogénatom vagy halogénatom, előnyösen hidrogénatom vagy klóratom.

Amint azt az (I) általános képlet mutatja, a Z csoport az aglükodalbaheptidek heptapeptid-láncában (jobbról kezdve) az ötödik és a hetedik aminosavnak megfelelő aminosavhoz kapcsolódik.

Az aromás gyűrűkben a bekarikázott számok az aglükodalbaheptid-lánc megfelelő aminosavaira utalnak, amelyekhez a speciális aril- vagy aralkil-csoport kötődik.

Az (I) általános képletben az Y karboxilcsoportot vagy a karboxilcsoport egy funkciós származékát, előnyösen észtert jelent. Az ilyen észter-származékok magukba foglalják a védett karboxilcsoportokat, amelyekből a szabad karboxilcsoport könnyen felszabadítható olyan speciális körülmények között, amely nincs hatással az aminosavláncre. Ez a meghatározás magában foglalja a kevés szénatomos alkil-észter-származékokat valamint a karboxilcsoport és olyan alifás alkoholok reakciójával képződött észtereket, amely alkoholok helyettesítőket (például halogénatomot, hidroxil-, kevés szénatomos alkoxi-, amino-, kevés szénatomos alkil-amino-, di(kéves szénatomos)alkil-amino-, ciano- és adott esetben kevés szénatomos alkilcsoporttal, alkoxicssoporttal, halogénatommal vagy nitrocsoporttal helyettesített fenilcsoportot) hordoznak az alifás láncban.

A "karboxilcsoport funkciós származéka" kifejezés a karboxamidokat is magában foglalja, ahogy azt a W092/10517



számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben leírják, ahol a (II) általános képletű tetrapeptid kiindulási anyagban az Y helyettesítő jelentését részletesen bemutatják. A fenti karboxamid csoportok a karboxilcsoport és alifás, cikloalifás valamint heterociklusos aminok reakciója eredményeként keletkező funkciós származékok. Közelebbről, az alifás aminok közül a kevés szénatomos alkil-aminok és a di(kevés szénatomos)alkil-aminok előnyösek, és adott esetben az alifás láncon amino-, kevés szénatomos alkil-amino-, di(kevés szénatomos)alkil-amino-, pirrolidino-, piperazino-, N-(kevés szénatomos)alkil-piperazino-, morfolino-, hidroxil-, kevés szénatomos alkoxi-, karboxil-, (kevés szénatomos)alkoxi-karbonil-, karbamil-, mono- és di(kevés szénatomos)alkil-karbamil- és hasonló csoportokat hordozhatnak; a cikloalifás aminok közül a 4-7 szénatomos cikloalifás primer aminok előnyösek; a heterociklusos aminok közül a telített, nitrogént tartalmazó 5-7 tagú heterogyűrűs csoportok, például a pirrolidin, morfolin, piperazin és az N-(kevés szénatomos)alkil-piperazin előnyösek.

Az (I) általános képletű végső vegyületek és a (II) általános képletű kiindulási vegyületek sói azok, amelyek a molekula bázikus csoportjaiból, például az NHR és/vagy NR_1R_2 aminocsoportokból valamely savval sóképzés révén keletkeznek.

Jellemző savaddíciós sók azok, amelyek szervesetlen vagy szerves savakkal, például hidrogén-kloriddal, kénsavval, foszforsavval, borostyánkőssavval, citromsavval, tejsavval,



maleinsavval, fumársavval, kólsavval, d-glutaminsavval, d-kámforsavval, glutársavval, ftálsavval, borkősavval, metánszulfonsavval, benzolszulfonsavval, benzoesavval, szalicilsavval, trifluor-ecetsavval és hasonlókkal végzett reakcióban keletkeznek. Más esetben sőt képezhetünk az Y helyén álló karboxilcsoportok és egy megfelelő bázis, például egy alkálifém-hidroxid vagy -karbonát vagy egy szerves amin, így egy mono-, di- vagy tri(kevés szénatomos)alkil-amin, egy mono-, di- vagy tri[hidrox-(kevés szénatomos)alkil]-amin reakciójával is.

Az (I) általános képletű aglükodalbaheptidek belső sói azok, amelyek olyan esetben jönnek létre belső sóképzéssel, amikor ugyanazon vegyületben megfelelő erősségű bázikus csoport (például aminocsoport) és savas csoport (például karboxilcsoport) egyidejűleg van jelen.

A fenti (I) általános képletben és a leírás más képleteiben valamint az igénypontokban az aglükodalbaheptidek öt alap aril- és aril-metil-aminosav komponensének a királis centruma ugyanolyan abszolút konfigurációjú, mint a természetes dalbaheptidben, amelyből a (II) általános képletű tetrapeptid kiindulási anyagot kaptuk.

Azok a királis centrumok, amelyeket a találmány szerinti aglükodalbaheptidekbe szintetikusan vezettünk be és amelyeket 3-as és 15-ös indexszel jelölünk, mind R mind S abszolút konfigurációjúak lehetnek, attól függően, hogy a beépített aminosavnak milyen volt az abszolút konfigurációja.

A találmány előnyös megvalósítási módjának megfelelően azonban a 3-as indexszel jelzett bevezetett királis centrum konfigurációja S, míg a 15-ös indexszel jelzett királis centrum konfigurációja lehet R és S is, legelőnyösebben R.

A jelen találmány szerinti aglükodalbaheptidek legelőnyösebb csoportját azok az (Ia) általános képletű vegyületek, amelyekben

- Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport kevés szénatomos alkil-észter-származéka;
- R és R₁ egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az aminocsoportot védő csoport, előnyösen hidrogénatom;
- R₂ hidrogénatom;
- R₆ hidrogénatom;
- R₇ és R₈ egymástól függetlenül hidrogénatom vagy klóratom;
- R₉ hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, előnyösen hidrogénatom;
- R₁₀ hidrogénatom vagy hidroxilcsoport; és savakkal és bázisokkal, előnyösen gyógyászatilag elfogadható savakkal és bázisokkal képezett valamint belső sóik.

A jelen találmány szerinti (I) általános képletű aglükodalbaheptid antibiotikumok előállítási eljárása az 1. reakcióvázlaton látható.

Az 1. reakcióvázlaton a W és Z helyettesítők jelentése a fenti, míg a "karboxilcsoport funkciós származéka" Y vonatkozásában a karboxilcsoport egy fentebb leírt funkciós származékát jelenti, ezen belül védett karboxilcsoportot is,

amelyről a védőcsoportot az eljárás végén eltávolíthatjuk.

A reakcióvázlat első (a) lépése a (IIa) általános képletű tetrapeptidben az R_4 helyén álló aminocsoport szelektív megvédése, ekkor (IIb) általános képletű tetrapeptid keletkezik.

A szelektív védést például úgy valósíthatjuk meg, hogy először megvédjük a (IIa) általános képletű tetrapeptidben R_3 helyén álló reakcióképesebb aminocsoportot, majd megvédjük valamilyen más típusú védőcsoporttal az R_4 helyén álló aminocsoportot, amely nem hasad le azon körpülmények között, amelyek az R_3 helyén álló aminocsoport védőcsoportjának eltávolításához szükségesek.

Ez utóbbi művelet olyan (IIb) általános képletű tetrapeptid vegyülethez vezet, amelyben az R_4 aminocsoport védett és az R_3 aminocsoport szabad, és képes a kiválasztott aminosav-származékkal, azaz az N-védett fenil-alaninnal reagálni pentapeptid képzése közben, a (b) reakciólépésnek megfelelően. Ez a lépés az N-védett fenil-alanin prekursorból származó N-védőcsoport eltávolításával válik teljessé, így egy (III) általános képletű pentapeptid keletkezik.

A fenti (b) lépésben leírt reakció olyan reakciókörülmények alkalmazását foglalja magában, amelyek között Y helyén egy szabad karboxilcsoport jelenléte negatív hatással lenne a reakcióra. Ezért előnyös olyan (IIb) általános képletű tetrapeptid-származékot használni, amelyben Y a fenti karboxilcsoport valamely funkciós származéka, annak érdekében, hogy elkerüljük a szabad karboxilcsoport bármi-

lyen nemkívánatos reakcióját, amikor a (III) általános képletű pentapeptid előállítására céljából az N-védett fenilalanin és a (IIb) általános képletű tetrapeptid kapcsolásához kondenzációs körülményeket alkalmazunk.

Hasonló okból előnyös az Y helyén álló karboxilcsoport védettségét fenntartani azokban az egymást követő lépésekben is, amikor más peptidkötések kialakítása történik.

A fentebb említett reakciólépések végzésekor valamint az azt követő reakciókban nem szükséges azokat a fenolos és benziles hidroxilcsoportokat megvédeni, amelyek a tetrapeptid és pentapeptid W és Z helyettesítőiben lehetnek jelen. Azonban, ha ezek a hidroxil-védőcsoportok a (II) általános képletű tetrapeptidben már eredetileg is benne vannak, ahogy azokat a WO92/10517 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésnek megfelelően kapjuk, megtarthatjuk ezeket a csoportokat a következő reakciók folyamán, és kívánt esetben a teljes eljárás végén lehasíthatjuk, amikor is az (Ib) vagy (Ic) általános képletű aglükodalbaheptideket kapjuk.

A következő (c) lépés egy intramolekuláris kondenzációt foglal magába a (III) általános képletű pentapeptid szabad aminocsoportja és a COOR_5 általános képletű karboxilcsoport között, amelyben R_5 hidrogénatom. Ebben az esetben is negatív hatással lenne a reakcióra egy további, a pentapeptidben az Y helyén jelenlevő szabad karboxilcsoport. Valójában, az ilyen további karboxilcsoport részt venne egy intermolekuláris kapcsolási reakcióban a szabad aminocso-



porttal, ami nemkívánt melléktermékeket eredményezne. Ezért, ebben az esetben különösen fontos az ilyen karboxilcsoport védettségét fenntartani, ahogy azt a fentiekben leírtuk. A (c) lépés magában foglalja az R_4 helyén álló aminocsoport védőcsoportjának eltávolítását is, ekkor egy (IV) általános képletű közbenső hexapeptid keletkezik.

A következő, (d) lépés a másik aminosav kapcsolása egy N^{α}, N^{ϵ} -védett lizin-származékkal való kondenzáció révén, ekkor (Ib) általános képletű aglükodalbaheptid-származék képződik, amelyet a következő (e) lépésben egy védőcsoport eltávolításnak vethetünk alá, azaz a lizin molekularész aminocsoportjait tehetjük szabaddá. Kívánt esetben, ha Y egy könnyen hasítható karboxil-védőcsoport, a védett karboxilcsoportról is eltávolíthatjuk a védőcsoportot, így olyan (Ic) általános képletű aglükodalbaheptid keletkezik, amelyben Y karboxilcsoport.

A következő leírásban további részleteket adunk meg arra vonatkozóan, hogy a fentebb leírt eljárás egyes lépéseit hogyan valósíthatjuk meg.

(a) lépés:

Ezen lépés megvalósításának kulcspontja a primer aminocsoport védőcsoportjának bevezetésére szolgáló megfelelő reagens megválasztása, amely előnyösen a (IIa) általános képletű vegyületben az R_3 helyén álló aminocsoporttal reagál.

Tekintettel erre a kívánt hatásra, azt találtuk, hogy kielégítő szelektivitást és hozamot érünk el, ha az N-vé-

dőcsoport bevezetésére a di(terc-butil)-dikarbonátot alkalmazzuk reagensként.

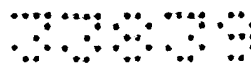
Ezt a reagenst kb. ekvimoláris mennyiségben reagáltatjuk a (IIa) általános képletű tetrapeptiddel víz és egy közömbös, vízzel elegyedő szerves oldószer, például kevés szénatomos alkanol, acetón, tetrahidorfurán, dioxán és dimetoxi-etán elegyével készült oldatban, -5 és 20°C közötti, előnyösen 0 és 10°C közötti hőmérsékleten, 6 és 8 közötti, előnyösen $6,5$ és $7,5$ közötti pH-n.

A víz és a szerves oldószer aránya $1:9$ és $9:1$ között, előnyösen $4:6$ és $6:4$ között változik.

A kívánt (IIa) általános képletű terméket, amelyben R_3 terc-butoxi-karbonil-amino-csoport (minden más szimbólum az 1. reakcióvázlatban megadott jelentésű), általában valamilyen olyan (IIa) általános képletű melléktermékkel együtt kapjuk, amelyben R_3 és R_4 terc-butoxi-karbonil-amino-csoport.

A mellékterméket könnyen elválaszthatjuk a kívánt mono-védett terméktől, például úgy, hogy egy olyan vizes-savas elegyet, amely mindkét terméket tartalmazza, vízzel nemelegyedő oldószerrel extrahálunk.

A kinyert mellékterméket a védőcsoportot nem tartalmazó kiindulási anyaggá alakíthatjuk savas, például trifluor-ecetsavas hidrolízissel. A regenerált kiindulási anyagot azután ismét di(terc-butil)-dikarbonáttal reagáltatjuk a fentebb leírt körülmények között. Szükséges esetben a melléktermék regenerálási eljárását, majd a di(terc-butil)-



dikarbonátos reakciót két vagy három alkalommal megismételhetjük annak érdekében, hogy a kívánt mono-védett terméket magas átalakulási hozammal kapjuk.

A mono-védett terméket azután további közbenső eljárásnak vetjük alá az R_4 helyén álló szabad aminocsoport olyan csoporttal való védésére, amely a terc-butoxi-karbonil-csoport eltávolításához szükséges savas körülmények között nem hasítható le. A fenti hatás eléréséhez a reagenseket azok közül választhatjuk, amelyek karbamát-származékokat képeznek.

Ilyen reagensek és a vonatkozó reakciókörülmények például T. W. Greene és P. G. M. Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis" (második kiadás, J. Wiley, N. Y., 1991) című munkájában vannak leírva (ld. különösen a 315-348 oldalakat).

Ennek megfelelően a következő védőcsoportok különösen alkalmasak az R_4 szimbólummal jelölt aminocsoportok védésére a (IIb) általános képletű tetrapeptidben: 9-fluorenil-metoxi-karbonil-, 9-(2-szulfo)-fluorenil-metoxi-karbonil-, 9-(2,7-dibróm)-fluorenil-metoxi-karbonil-, 2,7-di(terc-butyl)-[9-(10,10-dioxo-tioxán-tenil)]-metoxi-karbonil-, 1,1-dimetil-2,2-dibróm-etoxi-karbonil-, 1,1-dimetil-2,2,2-triklór-etoxi-karbonil-, allil-oxi-karbonil-, benzil-oxi-karbonil-, p-nitro-benzil-oxi-karbonil-, p-bróm-benzil-oxi-karbonil-, 2,4-diklór-benzil-oxi-karbonil- és a 4-(metil-szulfinil)-benzil-oxi-karbonil-csoport.

A jelen találmány előnyös megvalósításának megfelelően

a (IIa) általános képletű vegyületben az R_4 helyén álló aminocsoport védőcsoportjaként a benzil-oxi-karbonil-csoportot alkalmazzuk. A védeés úgy történik, hogy a fentebb említett (IIa) általános képletű mono-védett tetrapeptidet, amelyben R_3 terc-butoxi-karbonil-amino-csoport, az ilyen benzil-oxi-karbonil-csoportnak az aminocsoportra való bevezetésére képes alkalmas reagenssel, például benzil-klór-formiáttal gyenge bázis, például nátrium-hidrogén-karbonát, kálium-hidrogén-karbonát vagy tri(kevés szénatomos)alkil-amin feleslegének jelenlétében reagáltatjuk.

A reaktánst, amely az N-védőcsoportot szolgáltatja, általában a tetrapeptidre vonatkoztatva ekvimoláris mennyiségben reagáltatjuk. Azonban bizonyos esetekben szükséges lehet az ilyen reagenst kis (legfeljebb 20 %) molekuláris feleslegben alkalmazni a reakció teljessé tétele érdekében.

A reakciót általában oldószer jelenlétében, előnyösen víz és egy vízzel elegyedő szerves oldószer elegyében végzzük, ilyen elegyekre példákat a terc-butoxi-karbonil-csoport bevezetésével kapcsolatban említettünk. A reakcióhőmérsékletet 0 és 50°C, előnyösen 15 és 30°C között tartjuk. A fenti eljárásban kapott kétszeresen védett tetrapeptideket ezután savas kezelésnek vetjük alá a terc-butoxi-karbonil-csoport szelektív eltávolítására.

Az ilyen kezelés például abból áll, hogy a kétszeresen védett tetrapeptidet feleslegben vett száraz trifluor-ecetsavval hozzuk érintkezésbe 5 és 30°C közötti hőmérsékleten, 5-25 percig.



A (IIb) általános képletű tetrapeptidet, amelyben R_4 benzil-oxi-karbonil-amino-csoport (az összes további szimbólum az 1. reakcióvázlatra megadott jelentésű), önmagában ismert módon nyerjük ki a reakcióközegből.

(b) lépés:

Ebben a lépésben a (IIb) általános képletű N-védett tetrapeptidet egy alkalmas fenil-alanin-származékkal reagáltatjuk. Az ilyen származéknak védettnek kell lennie az aminocsoporton és egy aktiváló csoportot kell tartalmaznia a karboxilcsoporton, amely elősegíti a kondenzációs folyamatot. A fenil-alanin aminocsoportját védő csoportnak eltérőnek kell lennie a tetrapeptid R_4 csoportjától, mivel a következő lépésben olyan körülmények között kell majd eltávolítani, amelyek között az ilyen R_4 csoport nem szenved változást.

Ennek a problémának egyik megoldása, hogy karbamát-képző csoportot alkalmazunk, amely az (a) lépésben alkalmazott körülmények között hasítható. A terc-butoxi-karbonil-csoport ezért egyike a fenil-alaninon alkalmazható előnyös N-védőcsoportoknak.

Az N-védett fenil-alanin karboxilcsoportját aktiváló csoportot a szokásos aktív észter-csoportot képzők közül választhatjuk.

Az aktív észterekre példaként azokat említjük, amelyeket a peptid-kapcsolásra alkalmas aminosav-észterekként az L. F. Fieser és M. Fieser szerzők a "Reagent for organic

Synthesis" (J. Wiley, New York) című munkában leírtak.

Aktív észtereket képező reagensek, amelyek az N-védett fenil-alanin karboxilcsoportjának aktiválására használhatók, például azok, amelyeket R. Schwyzzer és munkatársai a *Helv. Chim. Act.*, 1955, 38, 69-70 irodalmi helyen leírtak, és ezek többek között a következők:

ClCH_2CN , $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, $\text{BrCH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$, $\text{ClCH}_2\text{COCH}_3$, $p\text{-ClCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$.

Az N-védett fenil-alanin karboxilcsoportjának aktiválására alkalmas más csoportok, amelyek a jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazhatók, a karboxilcsoportnak a (c)-(j) képletű hidroxil-vegyületekkel alkotott észterei, miként azt J. Jones a "The Chemical Synthesis of Peptides" című munkában (Clarendon Press-Oxford, 1991) leírja.

A találmány egyik előnyös megvalósítása szerint az N-védett fenil-alanin N-hidroxil-szukcinimiddal alkotott észterét alkalmazzuk a (IIb) általános képletű tetrapeptiddel való kondenzációs reakcióban.

A kondenzációs reakciót a polipeptidek képződéséhez szükséges általános körülmények között végezzük. Általában a két reaktánst kb. ekvimoláris mennyiségben [kb. ekvimoláris mennyiségű szerves tercier amin, például tri(kevés szénatomos)alkil-amin jelenlétében, ha a (IIb) általános képletű vegyületben az R_3 aminocsoport savaddíciós só formájában van jelen] közömbös szerves oldószerben, 5 és 35°C közötti, előnyösen 15 és 25°C közötti hőmérsékleten reagáltatjuk. A közömbös szerves oldószert általában szerves amidok (például



dimetil-formamid), poliéterek (például dimetoxi-etán), gyűrűs éterek (például tetrahidrofurán), kevés szénatomos alifás észterek (például etil-acetát) és dimetil-szulfoxid közül választjuk. Egyik előnyös oldószer a dimetil-formamid.

A kondenzációs reakcióban képződött kétszeresen védett pentapeptid-származékot a fenil-alanin-maradék N-védett aminocsoportjának hasítását elősegítő körülmények között reagáltatjuk, anélkül, hogy az R_4 helyén álló N-védett aminocsoport változást szenvedne, így (III) általános képletű pentapeptidet kapunk. Abban az esetben, amikor a fenil-alanin aminocsoportja terc-butil-karbamát formájában védett és R_4 benzil-oxi-karbonil-amino-csoport, az előnyös kezelés lényegében azonos azzal, amelyet az (a) lépés végén a megfelelő tetrapeptidben az R_3 aminocsoport terc-butoxi-karbonil-védőcsoportjának eltávolítására alkalmaztunk.

(c) lépés:

A (III) általános képletű mono-védett pentapeptidet, amelyet az előző reakcióban kaptunk, intramolekuláris kondenzációnak vetjük alá, hogy a fenil-alanin-molekularész szabad aminocsoportja és a COOR_5 általános képletű karboxilcsoport között, amelyben R_5 hidrogénatom, peptidkötés alakuljon ki.

Az intramolekuláris kondenzáció nyilvánvalóan csak jól meghatározott körülmények között, a megfelelő kondenzáló szerek, oldószerek, reagensarányok és hőmérséklet megválasztása mellett megy végbe. Az intramolekuláris reakció a



(III) általános képletű pentapeptid COOR_5 általános képletű karboxilcsoportjának aktiválásán keresztül játszódik le, amelyhez a karboxilcsoportot diciklohexil-karbodiimid jelenlétében N-hidroxi-benzotriazollal reagáltatjuk. A pentapeptid aktivált karboxi-származékának képződéséhez olyan körülmények szükségesek, amelyek között a COOR_5 csoport először egy szerves tercier aminnal, például dietil-aminnal, N-metil-pirrolidinnel, N-metil-piperazinnal vagy N-metil-morfolinnal sőt képez, még mielőtt az N-hidroxi-benzotriazollal reagálna. A pentapeptidet, a szerves amint és az N-hidroxi-benzotriazolt kb. ekvimoláris mennyiségben, míg a diciklohexil-karbodimidet 10-20 %-os mólfeleslegben alkalmazzuk. A reakciót előnyösen oldószerkeletben játszadjuk le, amely dimetil-formamid és metilén-diklorid kb. azonos térfogataiból áll. A reakcióelegy hőmérsékletét 10 és 35°C között tartjuk annyi ideig, amennyi az intramolekuláris kondenzáció teljessé válásához szükséges. A megfelelő reakcióidőt úgy határozhatjuk meg, hogy a reakciót a szokásos analitikai rendszerekkel, így vékonyréteg-kromatográfiás vagy HPLC módszerekkel követjük.

Az ebből a reakcióból kinyert szilárd anyagot fordított fázisú oszlopkromatográfiás eljárással, például szilikagélen, 10-től 70 %-ig változó mennyiségű acetonitril és víz lineáris gradiens elegyét alkalmazva tisztíthatjuk, és az összegyűjtött frakciókat HPLC módszerrel ellenőrizzük. A tiszta N-védett hexapeptidet tartalmazó frakciókat egyesítjük, és bepárlás után a terméket egy nem-oldószer, például

dietyl-éter hozzáadásával kicsapjuk. Szervetlen szennyezések lehetnek jelen a kicsapott termékekben, ezeket úgy távolíthatjuk el, hogy a terméket dimetil-szulfoxidhoz adjuk, a szuszpenziót szűrjük és a tiszta szűrletet liofilizáljuk.

Az N-védett hexapeptidet azután a (IV) általános képletű hexapeptiddé alakítjuk az R_4 helyén álló aminocsoport védőcsoportjának eltávolításával. A fenti védőcsoportot a fentebb említett speciális irodalomban az N-védő csoportokra vonatkozóan ajánlott megfelelő módszerek alkalmazásával távolíthatjuk el. Ha az R_4 helyén álló aminocsoport N-védőcsoportja benzil-oxi-karbonil-csoport, az ilyen védőcsoport eltávolítása általában légköri nyomáson és szobahőmérsékleten, szerves oldószer vagy szerves oldószerkeverék, és előnyösen egy vizes ásványi sav, például 1N sósav jelenlétében katalitikus hidrogénezéssel történik. Ilyen esetben a (IV) általános képletű hexapeptidet a hidrogénező oldatból kiszűrve a fenti ásványi savval alkotott sója formájában kapjuk.

(d) lépés:

A (c) lépés szerinti (IV) általános képletű hexapeptidet egy karboxilcsoportján aktivált N^α, N^ϵ -védett lizinszármazékkal kondenzáljuk. A lizin N-védésére és a karboxilcsoportjának aktiválására ugyanazokat a reagenseket alkalmazzuk, amelyeket a (b) lépésben a fenil-alanin N-védésére és karboxilcsoportjának aktiválására használtunk. A reakciókörülmények és a reagensek kölcsönös arányai vala-



mint a kinyerési eljárás lényegében azonosak a fentebb említett esetben alkalmazottakkal.

Ezen kondenzáció eredménye egy (Ib) általános képletű aglükodalbaheptid, amelyben a lizin-rész mindkét aminocsoportja N-védőcsoportot hordoz.

(e) lépés:

Ezt a lépést elsősorban az (Ib) általános képletű aglükodalbaheptid két N-védőcsoportjának eltávolítása céljából végezzük. Ezzel az eltávolítással nincs különösebb gond. Különösen, ha az N-védőcsoportok terc-butoxi-karbonil-csoportok, az eltávolítást lényegében ugyanolyan trifluor-ecetsavas kezeléssel végezzük, mint amelyet a (c) lépésben kapott pentapeptid fenil-alanin molekularészén levő terc-butoxi-karbonil-csoport eltávolítására leírtunk. Az (Ic) általános képletű aglükodalbaheptidet a fenti kezelés után szabad bázis formájában kaphatjuk, ha a trifluor-ecetsavas oldat bepárlásakor kapott maradékot vizes alkáli-oldattal kezeljük 8,5-es pH-n. Az aglükodalbaheptid szabad bázist fordított fázisú oszlopkromatográfiás eljárással még tovább tisztíthatjuk, lényegében ugyanazon eljárást és körülményeket alkalmazva, mint amelyeket a (c) lépésben a (IV) általános képletű hexapeptid tisztításánál használtunk.

Az (Ic) általános képletű aglükodalbaheptid, amelyben Y védett karboxilcsoport, kívánt esetben a megfelelő, szabad karboxilcsoportot tartalmazó származékká alakítható a védő-

csoport eltávolításával.

Például, ha a védett karboxilcsoport kevés szénatomos alkanollal képzett észter, az ilyen észter hidrolízisét úgy végezhetjük, hogy a terméket tetrahidrofuránban szuszpendáljuk, és a szuszpenzióhoz 10-50 % moláris feleslegben 1N nátrium-hidroxidot adunk. A fenti körülmények nincsenek hatással a molekula többi részére.

Ha az (Ic) általános képletű aglükodalbaheptid Y helyettesítője a karboxilcsoport olyan származéka, amely nem hasítható könnyen enyhe körülmények között, az ilyen csoport változatlanul marad a végtermékben, amely termék azonban szintén a találmány körébe tartozik.

Az olyan (Ic) általános képletű aglükodalbaheptid, amelyben az Y helyettesítő karboxilcsoport, olyan (Ic) általános képletű aglükodalbaheptiddé alakítható, amelyben Y az ilyen karboxilcsoport funkciós származéka, például észter vagy amid, amint azt fentebb leírtuk. Az ilyen funkciós származékoknak a megfelelő szabad karboxil-vegyületből való előállítása széles körben ismertetésre került a dalbaheptidek irodalmában. Lásd különösen az alábbi szabadalmi bejelentéseket: a 216775, 340245, 370283, 376041, 351685 és 460448 számon közzétett európai szabadalmi bejelentéseket és a WO93/0360 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentést.

A fenti 1. reakcióvázlat megvalósításának egyik speciálisan jellemző példájában az aglükoteikoplaninból származó (IIa) általános képletű tetrapeptidet használjuk



kiindulási anyagként. Az említett tetrapeptid szerkezete az (V) képlettel jellemezhető, és a leírás további részében és a példákban ATTP-metil-észterként utalunk rá. Hogy világos legyen, és az ezen leírást követő példák jobban érthetők legyenek, a fenti képletben a két különböző aminocsoport nitrogénatomját A és B betűvel különböztetjük meg.

A fentebb leírt soklépéses eljárást követve és a (b) és a (d) lépésekben az L-fenil-alanin és D-lizin aminosavak megfelelő védett formáját alkalmazva (VI) képletű, az (Ic) általános képlet alá tartozó vegyületet kapunk, a képletben a 3-as és 15-ös indexszel jelölt királis centrumok abszolút konfigurációja S és R.

Ez a reakciósorozat a megfelelő (III) és (IV) általános képletű pentapeptid és hexapeptid közbelső termékeken keresztül megy végbe, amelyeket szokásosan N^B-védett-(L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észternek és (L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észternek nevezünk.

A fenti vegyületet szokásosan (L-fenil-alanil)³-(D-lizil)¹⁵-aglükoteikoplanin-dalbaheptid-metil-észternek [(L-fenil-alanil)³-(D-lizil)¹⁵-ATDH-metil-észternek] nevezzük, amelyben a 3-as és 15-ös felső indexek azt mutatják, hogy az aminosav-egységek, amelyek A. Malabarba és munkatársai szerint [J. Antibiotics 42, 1684-1697 (1989)] a 3-as és 15-ös számmal jelzett szénatomokat tartalmazzák, az aglükoteikoplanin alapvázban L-fenil-alanin- és D-lizin-csoporttal vannak helyettesítve. A királis centrumok abszolút konfigurációja a 3-as és 15-ös indexszel jelölt helyen S és R,



amint az fentebb leírtuk.

Ez a vegyület figyelemreméltó antibmikrobiális aktivitást mutat *in vitro* kísérletekben, az eredmények az 1. táblázatban láthatók, ahol a teikoplanint és a teikoplanin aglikont használtuk összehasonlító vegyületként.

1. táblázat
MIC (mg/liter)

(L szám)	Törzs	A	B	C
(165)	Staph. aureus Tour	0,13	0,13	0,13
(819)	S. aureus Smith	0,13	0,25	0,06
(561)	S. aureus klinikai izolátum	0,06	8	0,13
(147)	S. epidermidis ATCC 12,228	0,13	8	0,06
(533)	S. epidermidis klinikai izolátum	0,13	8	0,016
(602)	S. haemolyticus klinikai izolátum	0,5	32	0,25
(49)	Strep. pyogenes C203	0,25	0,13	0,13

(44)	Strep. pneumoniae UC41	0,13	0,13 0,13

(149)	Enterococcus faecalis		
	ATCC 7,080	0,5	0,13 0,13

(502)	E. faecalis klinikai izolátum 16		>128 >128

A = (L-fenil-alanil) ³ -(D-lizil) ¹⁵ -aglükoteikoplanin-dalba-			
heptid-metil-észter			
B = teikoplanin			
C = teikoplanin aglikon			

A vegyületek *in vitro* antibakteriális hatását standard agarhígításos vizsgálattal mikrotiterlemezen határoztuk meg. IsoSensitest (Oxoid) táptalajt használtunk minden baktérium esetében, kivéve a streptococcusokat (Todd-Wewitt táptalaj, Difco) és az enterococcusokat (Mueller-Hinton, Difco). A tenyészeteket úgy hígítottuk, hogy a végső inokulum koncentrációja kb. 5×10^5 telepképző egység/ml legyen. Minden mikrohígítás MIC értékének meghatározását 0,01 % marhaszérum albumin (Pentax V frakció, Sigma) jelenlétében végeztük. A MIC (minimális gátló koncentráció) az a legkisebb koncentráció, amely esetében 37°C-on 18-24 órás inkubálás után nincs látható növekedés.

A fenti, szintetikusan kapott aglükodalbaheptid, míg lényegében megtartja a teikoplanin aglikon aktivitását a



legtöbb baktériummal szemben, amelyek általában érzékenyek dalbaheptidekre, meglepően hatásos egy Enterococcus faecalis klinikai izolátummal szemben, amely mind a teikoplaninnal, mind a teikoplanin aglikonnal szemben rezisztens.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával és kiindulási anyagként más tetrapeptid vegyületeket választva, amelyek a W092/10517 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés szerint állíthatók elő, egy sor (I) általános képletű szintetikus aglükodalbaheptidet kaphatunk.

Emellett, a C₃ és C₁₅ szénatomokon eltérő konfigurációjú (I) általános képletű vegyületeket állíthatunk elő megfelelő kiralitású fenil-alanin és lizin kiindulási vegyületek alkalmazásával. Ha racém aminosavakat használunk, az (I) általános képletű vegyületeket diasztereomer elegyek alakjában kapjuk.

A jelen találmány szerinti vegyületeket humán- és állatgyógyászatban alkalmazható mikrobaellenes készítmények hatóanyagaként használhatjuk, amelyek olyan patogén baktériumok által okozott fertőzőses betegségek megelőzésére és kezelésére, amelyek a fenti hatóanyagra érzékenyek, különösen Streptococcus, Staphylococcus és Enterococcus törzsek, ezen belül Enterococcus faecalis törzs által okozott fertőzés kezelésére alkalmasak, ez utóbbi törzs a teikoplaninnal, a súlyos fertőzőses betegségek gyógykezelésére jelenleg alkalmazott antibiotikummal szemben rezisztens.

A jelen találmány szerinti vegyületeket orálisan topikálisan vagy parenterálisan adagolhatjuk, ezek közül a



parenterális adagolási mód előnyös.

Az adagolás módjától függően ezeket a vegyületeket különféle dózisformákká alakíthatjuk.

Az orális adagolásra alkalmas készítmények a kapszulák, tabletták, folyékony oldatok vagy szuszpenziók. Amint az a szakterületen ismert, a kapszulák és a tabletták a hatóanyag mellett szokásos segédanyagokat, így hígítószeret, például laktózt, kalcium-foszfátot, szorbitot és hasonlókat, kenőanyagokat, például magnézium-sztearátot, talkumot, polietilén-glikolt, kötőanyagokat, például polivinilpirrolidont, zselatint, szorbitot, tragant-mézgát, akácmézgát, ízesítő anyagokat és elfogadható szétesést elősegítő és nedvesítő szereket tartalmazhatnak. A folyékony készítmények általában vizes vagy olajos oldatok vagy szuszpenziók, amelyek szokásos adalékokat, például szuszpendáló szereket is magukban foglalhatnak.

A jelen találmány szerinti vegyületekből topikális alkalmazásra olyan alkalmas készítményeket állíthatunk elő, amelyek az orr és torok nyálkahártyáján vagy a légúti szöveteken át felszívódni képesek, ezek lehetnek folyékony permetek vagy inhalálószer, pasztillák vagy torokecsetek.

A szemek vagy fülek gyógyítására a készítmények folyékony vagy félfolyékony formában lehetnek. Helyi alkalmazásra hidrofób vagy hidrofil alap felhasználásával kenőcsöket, krémeket, tejekeket, ecsetelőket vagy porokat készíthetünk.

A találmány szerinti vegyületeket rektálisan kúpok formájában adagoljuk, amelyhez a hatóanyagot a szokásos



vivőanyagokkal, például kakaóvajjal, viasszal, cetvelőolajjal vagy polietilén-glikollokkal és azok származékai-val keverjük.

Az injektálható készítmények olajos vagy vizes hordozóval készült szuszpenziók, oldatok vagy emulziók lehetnek, és formáláshoz szükséges szereket, például szuszpendáló, stabilizáló és/vagy diszpergáló szereket tartalmazhatnak.

Más esetben a hatóanyag por formában is lehet, amelyet a beadás előtt megfelelő hordozóval, például steril vízzel folyékony alakra hozunk.

A hatóanyag beadandó mennyisége különféle tényezőktől, például a kezelendő egyén méretétől és állapotától, az adagolás módjától és gyakoriságától és az alkalmazott szer-től függ.

A találmány szerinti vegyületek általában kb. 1 és kb. 40 mg hatóanyag/kg testtömeg közötti mennyiségben hatásosak.

A speciális vegyület jellemzőitől, a beteg fertőzésétől függően a hatásos dózist napi egyetlen alkalommal vagy 2-4 részre osztva adhatjuk be. Különösen kívánatosak azok a készítmények, amelyek kb. 30 és kb. 500 mg/egység mennyiségű hatóanyagot tartalmazó egységdózis formájában készülnek.

1. példa

N^B-(Benzil-oxi-karbonil)-aglükoteikoplanin-tetrapeptid-metil-észter előállítás [N^B-CBZ-ATTP-metil-észter;

1. reakcióvázlat, (IIb) általános képlet]



i) N^A -(terc-Butoxi-karbonil)-aglükoteikoplanin-tetrapeptid-metil-észter (N^A -t-BOC-ATTP-metil-észter) előállítása

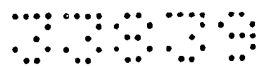
3 g (kb. 3 mmol) ATTP-metil-észter (a vegyület szintézisét a W092/10517 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben írják le) 100 ml dioxán:víz = 1:1 eleggyel készült oldatának pH-ját keverés közben, szilárd nátrium-hidrogén-karbonát adagolásával 7-re állítjuk. Ezután az oldatot 0°C-ra hűtjük, és 0,65 g (kb. 3 mmol) di(terc-butil)-dikarbonát 20 ml dioxánnal készült oldatát adjuk hozzá. A reakcióelegyet 0°C-on 18 órán át keverjük, majd 400 ml víz:etil-acetát = 1:1 elegybe öntjük.

Az elegy pH-ját 1N sósavval 3-ra állítjuk, majd

a) a szerves réteget elválasztjuk, 3 x 100 ml vízzel mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk és azután 30°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 25 ml-re bepároljuk. 100 ml dietil-éter hozzáadására szilárd csapadék válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 1,4 g N^A, N^B -di(t-BOC)-ATTP-metil-észter mellékterméket kapunk (HPLC: A) módszer, t_R = 25,2 perc);

b) a vizes fázist azonos térfogatú butanollal extraháljuk, és a butanolos réteget 40°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 30 ml-re bepároljuk. 100 ml dietil-éter hozzáadására szilárd csapadék válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 1,5 g N^A -t-BOC-ATTP-metil-észtert kapunk (2. táblázat, 1. vegyület; HPLC: A) módszer, t_R = 16,4 perc).

A fenti kétszeresen védett mellékterméket, az 1,4 g N^A, N^B -di(t-BOC)-ATTP-metil-észtert 50 ml trifluor-ecetsavval



10 percig, szobahőmérsékleten kezeljük az ATTP-metil-észter regenerálására, így 1,15 g terméket kapunk, amelyet 0,7 g N^A -t-BOC-ATTP-metil-észterre és 0,5 g fenti melléktermékké alakítunk a fenti körülmények között. Ezen eljárás három alkalommal való megismétlésével az ATTP-metil-észter kb. 80 %-ban alakul N^A -t-BOC-ATTP-metil-észterre.

ii) N^A -(terc-Butoxi-karbonil)- N^B -(benzil-oxi-karbonil)-
-aglükoteikoplanin-tetrapeptid-metil-észter (N^A -t-BOC- N^B -
-CBZ- ATTP-metil-észter) előállítása

2,35 g (kb. 2,3 mmol) N^A -t-BOC-ATTP-metil-észter 100 ml dioxán:víz = 1:1 eleggyel készült kevert oldatának pH-ját nátrium-hidrogén-karbonáttal 7-re állítjuk, majd az oldathoz 0,32 ml (kb. 2,3 mmol) benzil-klór-formiát 10 ml dioxánnal készült oldatát csepegtetjük szobahőmérsékleten, 10 perc alatt. A reakcióelegyet ezután szobahőmérsékleten 20 percig keverjük, majd 150 ml vízbe öntjük. A keletkezett opálos oldat pH-ját 1N sósavval 3-ra állítjuk, és az oldatot 200 ml etil-acetáttal extraháljuk. A szerves réteget elválasztjuk, nátrium-szulfáton szárítjuk és 30°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 20 ml-re bepároljuk. 100 ml dietil-éter hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 2,4 g N^A -t-BOC- N^B -CBZ-ATTP-metil-észtert kapunk (2. táblázat, 2. vegyület; HPLC: B) módszer, t_R = 11,8 perc).

iii) N^B -CBZ-ATTP-metil-észter előállítása

2,4 g N^A -t-BOC- N^B -CBZ-ATTP-metil-észter 100 ml száraz



trifluor-ecetsavval készült oldatát szobahőmérsékleten 10 percre keverjük, majd az oldószert 35°C-on, csökkentett nyomáson lepároljuk. Az olajos maradékot 300 ml víz:etil-acetát = 1:1 elegyben feloldjuk. A szerves réteget elválasztjuk, 2 x 150 ml vízzel mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk és azután 40°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 15 ml-re bepároljuk. 100 ml dietil-éter hozzáadására szilárd csapadék válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 2 g N^B-CBZ-ATTP-metil-észtert kapunk trifluor-acetát formájában (2. táblázat, 3. vegyület, az analitikai adatok a szabad bázisra vonatkoznak; HPLC: B) módszer, t_R = 8,3 perc).

2. példa

N^B-(Benzil-oxi-karbonil)-(L-fenil-alanil)³-aglükoteikoplanin-pentapeptid-metil-észter előállítás [N^B-CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észter; 1. reakcióvázlat, (III) általános képletű vegyület]

i) N^B-(Benzil-oxi-karbonil)-[N-(terc-butoxi-karbonil)-L-fenil-alanil]³-aglükoteikoplanin-pentapeptid-metil-észter [N^B-CBZ-(N-t-BOC-L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észter] előállítása

1 g (kb. 0,9 mmol) N^B-CBZ-ATTP-metil-észter-trifluor-acetát 20 ml dimetil-formamiddal készült oldatához keverés közben, szobahőmérsékleten 0,13 ml (kb. 0,9 mmol) trietil-amint, majd 0,34 g (kb. 0,9 mmol) N-t-BOC-L-fenil-alanin N-



-hidroxí-szukcinimiddel készült észterét (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) adjuk. 3 órás szobahőmérsékleten végzett keverés után az elegyhez 100 ml vizet adunk, és a keletkezett oldat pH-ját 1N sósavval 3-ra állítjuk. Az oldatot 100 ml n-butanollal extraháljuk, és a szerves réteget bepároljuk, így 0,9 g N^B -CBZ-(N-t-BOC-L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észtert kapunk (2. táblázat, 4. vegyület; HPLC: B) módszer, $t_R = 14,9$ perc);

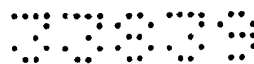
ii) [N^B -CBZ-(L-Fenil-alanil)³-ATPP-metil-észter] előállítása

220 mg N^B -CBZ-(N-t-BOC-L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észter 10 ml száraz trifluor-ecetsavval készült oldatát 15 percig szobahőmérsékleten keverjük, majd az oldószert 30°C-on, csökkentett nyomáson lepároljuk. Az olajos maradékot dietil-éterrel eldolgozzuk, így 200 mg N^B -CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észtert kapunk trifluor-acetát formájában (2. táblázat, 5. vegyület, az analitikai adatok a szabad bázisra vonatkoznak; HPLC: B) módszer, $t_R = 10,2$ perc).

3. példa

(L-Fenil-alanil)³-aglükoteikoplanin-hexapeptid-metil-észter [(L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észter; 1. reakcióvázlat, (IV) általános képletű vegyület] előállítása

i) N^B -(Benzil-oxi-karbonil)-(L-fenil-alanil)³-aglükoteikoplanin-hexapeptid-metil-észter [N^B -CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észter] előállítása



0,4 g (kb. 0,34 mmol) N^B-CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATPP-metil-észter 40 ml dimetil-formamid:metilén-diklorid = 1:1 oldószer eleggyel készült, kevert oldatához szobahőmérsékleten 0,047 g (kb. 0,34 mmol) N-hidroxibenzotriazol-hidrátot és 0,038 ml (kb. 0,34 mmol) N-metil-morfolint, végül 0,085 g (kb. 0,4 mmol) diciklohexil-karbodiimidet adunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd 30°C-on és csökkentett nyomáson a metilén-diklorid oldószeret lepároljuk. Ezután keverés közben, cseppenként 200 ml víz:etil-acetát = 1:1 elegyet adunk a maradékhoz. A keletkezett elegy pH-ját 1N sósavval 3-ra állítjuk, és az oldatlan anyagot kiszűrjük. Ezután a szerves réteget elválasztjuk, és az oldószer 35°C-on, csökkentett nyomáson lepároljuk. A szilárd maradékot 50 ml víz:acetonitril:n-butanol = 1:1:2 elegyben oldjuk és 5 g szilanizált szilikagél 60-t (0,06-0,2 mm; Merck) adunk hozzá keverés közben. 30 perc elteltével az oldószereket 45°C-on, csökkentett nyomáson eltávolítjuk, és a szilárd maradékot 35 g ugyanilyen szilanizált szilikagélből vízzel készült oszlop tetejére visszük. Az oszlopot 10-től 70 %-ig változó mennyiségű acetonitril és víz lineáris gradienseleggyével fejlesztjük ki 15 óra alatt, 100 ml/óra átfolyási sebesség mellett, miközben 10 ml-es frakciókat gyűjtünk, és ezek tartalmát HPLC módszerrel vizsgáljuk. A tiszta, cím szerinti vegyületet tartalmazó frakciókat egyesítjük és azonos térfogatú n-butanollal elegyítjük. A kapott oldatot 40°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 10 ml-re bepároljuk, és azután a mara-



dékhoz 100 ml dietil-étert adunk. A kivált szilárd csapadékot összegyűjtjük, és 20 ml dimetil-szulfoxidot adunk hozzá. A kapott szuszpenziót szűrjük, és a tiszta szűrletet liofilizáljuk. Így 0,11 g tiszta N^B-CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észtert kapunk (2. táblázat, 6. vegyület; HPLC: B) módszer, $t_R = 22,6$ perc).

A protonok ¹H-NMR-spektrum adatait (delta, ppm) az alábbiakban adjuk meg (a protonokat J. C. J. Barna és munkatársai által a J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 4895-4902 irodalmi helyen közölteknek megfelelően azonosítottuk):

8,69(w₅); 8,65(w₇); 8,38(w₄); 7,87(6b); 7,70(w₃); 7,46(w₂); 6,60(w₆); 6,44(7d); 6,23(4b); 6,10(7f); 5,82(x₄); 5,40(4f); 5,13(z₆); 4,97(CBZ-CH₂); 4,60(x₂); 4,60(x₅); 4,54(x₇); 4,25(x₃); 4,24(x₆); 3,71(COO-CH₃); 2,85, 2,72(z₂, z₂'); 2,43, 2,25(Phe-CH₂).

ii) (L-Fenil-alanil)³-ATHP-metil-észter előállítás

1,8 g (kb. 1,5 mmol) N^B-CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észtert 120 ml metanol:1N HCl:dimetil-formamid = 6:2:1 elegyben oldunk, és légköri (1 atmoszféra) nyomáson, 25°C-on 1,5 g 5 %-os szénhordozós paklládiumkatalizátor jelenlétében hidrogénezünk. A katalizátort kiszűrjük, és a metanolt csökkentett nyomáson, 35°C-on lepároljuk. A maradékhoz 100 ml vizet adunk, és a kapott oldatot 150 ml etil-acetáttal extraháljuk. A szerves réteget elöntjük, és a kapott vizes szuszpenziót 130 ml n-butanollal extraháljuk. A butanolos fázist elválasztjuk és 30°C-on, csökkentett nyomáson kb. 20



ml-re bepároljuk. 150 ml dietil-éter hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 0,65 g (L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észtert kapunk hidroklorid formájában (HPLC: B) módszer, $t_R = 17,5$ perc, a titer kb. 75 %), amelyet a következő lépésben további tisztítás nélkül használunk fel.

4. példa

(L-Fenil-alanil)³-(D-lizil)¹⁵-aglükoteikoplanin-dalbaheptid-metil-észter [(L-fenil-alanil)³-(D-lizil)¹⁵-ATDH-metil-észter; 1. reakcióvázlat, (Ic) általános képletű vegyület] előállítása

i) (L-Fenil-alanil)³-[N^α,N^ε-di(terc-butoxi-karbonil)-D-lizil]¹⁵-aglükoteikoplanin-dalbaheptid-metil-észter [(L-fenil-alanil)³-[N^α,N^ε-di(t-BOC)-D-lizil]¹⁵-ATDH-metil-észter)] előállítása

0,29 g nyers (L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észter-hidroklorid 3 ml dimetil-formamiddal készült, kevert oldatához szobahőmérsékleten 0,07 ml trietil-amint és 0,19 g N^α,N^ε-di(t-BOC)-D-lizin N-hidroxi-szukcinimiddal alkotott észterét adjuk (amelyet M. J. Marquisee és J. C. Kower által a J. Med. Chem. 21:1188-1194, 1978 irodalmi helyen leírt módszerrel állítunk elő). 1 nap eltelte után a reakcióelegyet 50 ml vízzel hígítjuk, és a keletkezett szuszpenzió pH-ját 1N sósavval 3-ra állítjuk. Az elegyet 50 ml n-butannal extraháljuk, a szerves réteget elválasztjuk és 25 ml

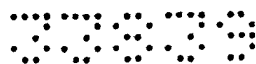


vízzel mossuk, majd 45°C-on, csökkentett nyomáson kis térfogatra, kb. 3 ml-re bepároljuk. 30 ml dietil-éter hozzáadására szilárd csapadék válik ki, amelyet összegyűjtünk, így 0,27 g (L-fenil-alanil)³-[N^α,N^ε-di(t-BOC)-D-lizil]¹⁵-ATDH-metil-észtert kapunk (HPLC: B) módszer, $t_R = 22,5$ perc, a titer kb. 45 %). A vegyületet további tisztítás nélkül használjuk fel az utolsó lépésben.

ii) (L-Fenil-alanil)³-(D-lizil)¹⁵-ATDH-metil-észter előállítás

0,27 g nyers (L-fenil-alanil)³-[N^α,N^ε-di(t-BOC)-D-lizil]¹⁵-ATDH-metil-észtert 10°C-on 5 ml száraz trifluor-acetsavban oldunk. 10 perc eltelte után az oldószert 15°C-on, csökkentett nyomáson lepároljuk. Az olajos maradékot 30 ml víz:metanol = 1:1 elegyben feloldjuk, és a kapott oldat pH-ját 1 N nátrium-hidroxiddal 3,5-re állítjuk, majd az anyagot 50 g szilanizált szilikagélből készült oszlopra visszük. Az oszlopkromatografálást a 3. példában az N^B-CBZ-(L-fenil-alanil)³-ATHP-metil-észter tisztításánál leírt módon végezzük, így 0,05 g tiszta cím szerinti vegyületet kapunk trifluor-acetát formájában. A terméket ezután 1 ml vízben oldjuk, és az oldat pH-ját 1 N nátrium-hidroxiddal 8,5-re állítjuk. A szilárd csapadékot összegyűjtjük, és 2 x 2 ml vízzel mossuk. Ily módon 0,045 g cím szerinti vegyületet kapunk szabad bázisként. (2. táblázat, 7. vegyület; HPLC: B) módszer, $t_R = 18,3$ perc).

A protonok ¹H-NMR-spektrum adatait (delta ppm) az alábbiakban adjuk meg (a trifluor-acetátra vonatkozóan):



1,28; 1,45; 1,68; 2,93 (Lys-CH₂-k); 3,71 (COO-CH₃); 4,14-5,34 [peptid alfa-CH-k (x₁-x₇; a 4,14 ppm az x₁-hez és az 5,34 ppm az x₄-hez tartozik]; 6,64-8,59 (aromás protonok és peptid NH-k).

Analitikai eljárások

1) HPLC módszerek

A reakcióelegyek, az oszlopról lejövő eluátumok és a végtermékek összetételét HPLC analízissel vizsgáltuk, amelyet LiChrospher RP (5 μm) adszorbenssel előre megtöltött LiChroCART (125 x 4 mm, Merck) oszlopon végeztük, amelyhez egy 20 μl-es kacs injektorral (Rheodyne Model 7125) és UV detektorral ellátott folyadékkromatográfiás szivattyút (Varian Model 7125) használtunk. A kromatogramokat 254 nm-en vettük fel. Az eluálást 1,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett (a) 0,2 %-os vizes ammónium-formiát és (b) acetonitril eluálószereknek az alább megadott lineáris gradiensnek megfelelő arányú elegyével végeztük.

A) módszer:

Idő (perc)	:	0	10	20	30	35	45
% (b) (a)-ban:		5	23	26	35	75	5

B) módszer:

Idő (perc):		0	30	35	40	45
%(b) (a)-ban:		20	60	75	75	20



2) Sav-bázis titrálás

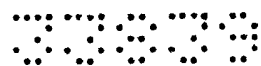
A sav-bázis titrálásokat a következőképpen végeztük: a mintát metil-celloszolv és víz 4:1 térfogatarányú elegyében feloldottuk, majd ugyanezen oldószereleggyel készült 0,01M sósavat feleslegben adtunk az oldathoz, és a keletkezett oldatot 0,01N nátrium-hidroxiddal titráltuk.

3) ^1H -NMR

Az ^1H -NMR-spektrumokat DMSO- d_6 oldószerrel készült oldatban 303K°-on vettük fel egy Bruker AM 500-as NMR-spektrométeren, amely Aspect 3000 számítógéppel volt felszerelve. Belső standardként $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ -t (delta 0,00 ppm) használtunk.

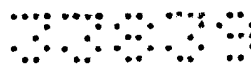
4) FAB-MS

A FAB-MS pozitívion spektrumokat Kratos MS-50 duplán fókuszáló tömegspektrométeren vettük fel 3000 dalton tömegtartományban, amelyhez 8 kV gyorsító feszültséget használtunk. A műszer számítógépes kontroll alatt működött. Ahhoz, hogy jó minőségű adatokat kapjunk, egy DS-90 adatrendszert a "nyers adatok" akvizícióban használtunk. A gyors atom bombázáshoz egy nyereg-terű atom-szórót alkalmaztunk Xe gázzal (2×10^{-5} nyomást mutatott az ionforrás szonda), 6 kV feszültség és 1 mA áramerősség mellett. A mintákat 0,2N sósavat tartalmazó metanol:víz = 1:1 elegyben vagy más esetben dimetil-formamidban oldottuk. Ezután az oldat 1 mikroliterét 1 mikroliter tioglicerinnel kevertük, amely adott esetben 1N ecetsavat tartalmazott.



2. táblázat
Analitikai adatok

Vegyület	Képlet	Molekulatömeg	FAB-MS	Sav-bázis
			[M+H] ⁺	titrálás e. tömeg
1	C ₄₈ H ₄₅ N ₅ O ₁₆ Cl ₂	1018,8	1020	535
2	C ₅₆ H ₅₁ N ₅ O ₁₈ Cl ₂	1152,9	1154	1200
3	C ₅₁ H ₄₃ N ₅ O ₁₆ Cl ₂	1052,9	1054	573
4	C ₆₅ H ₆₀ N ₆ O ₁₉ Cl ₂	1300,1	1301	1285
5	C ₆₀ H ₅₂ N ₆ O ₁₇ Cl ₂	1200,0	1201	587
6	C ₆₀ H ₅₀ N ₆ O ₁₆ Cl ₂	1182,0	1183	-----
7	C ₅₈ H ₅₆ N ₈ O ₁₅ Cl ₂	1176,0	1177	599



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) általános képletű aglükodalbaheptid, a képletben
W és Z egymástól függetlenül a dalbaheptid csoportba tartozó
valamely antibiotikum aglikonjának relatív része;
Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport valamely funk-
ciós származéka;

R és R_1 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az
aminocsoportot védő csoport;

R_2 hidrogénatom,

és savval vagy bázissal képezett sói valamint belső sói.

2. Az 1. igénypont szerinti aglükodalbaheptid, amelyben
Y, R, R_1 és R_2 jelentése az 1. igénypontban megadott;

W (a) általános képletű csoport, ebben

A hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxil-
csoportot védő csoport;

R_6 , R_7 és R_8 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy
halogénatom, ahol a halogénatom előnyösen
klór- vagy brómatom, és legelőnyösebben az
éterkötéshez képest orto-helyzetben van;

R_9 és R_{10} egymástól függetlenül hidrogénatom vagy OR_{15}
általános képletű csoport, amelyben

R_{15} hidrogénatom vagy egy, a benziles hidroxil-
csoportot védő csoport,

Z (b) általános képletű csoport, ebben

az OR_{11} és OR_{12} általános képletű csoportok előnyösen a



két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez viszonyítva para- és orto-helyzetben vannak, és az

R_{11} és R_{12} csoport egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxilcsoportot védő csoport;

az OR_{13} általános képletű csoport előnyösen a két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez képest orto-helyzetben van és az

R_{13} csoport hidrogénatom vagy egy, a fenolos hidroxilcsoportot védő csoport;

az R_{14} csoport előnyösen a két fenilgyűrűt összekapcsoló kötéshez képest meta-helyzetű és hidrogénatom vagy halogénatom, előnyösen hidrogénatom vagy klóratom,

az aromás gyűrűkben a bekarikázott számok azt mutatják, hogy az aglükodalbaheptid lánc aminosavjai közül melyikhez kapcsolódik a szóbanforgó aril- vagy aralkilcsoport.

3. Az 1. igénypont szerinti (Ia) általános képletű aglükodalbaheptidek, a képletben

Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport kevés szénatomos alkil-észter-származéka;

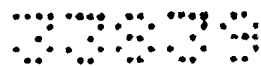
R és R_1 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az aminocsoportot védő csoport, előnyösen hidrogénatom;

R_2 hidrogénatom;

R_6 hidrogénatom;

R_7 és R_8 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy klóratom;

R_9 hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, előnyösen hidrogénatom;



R_{10} hidrogénatom vagy hidroxilcsoport;

és savakkal és bázisokkal, előnyösen gyógyászatilag elfogadható savakkal és bázisokkal képezett sóik, valamint belső sóik.

4. Az 1., 2. és 3. igénypontok bármelyike szerinti aglükodalbaheptid, amelyben a 3-as indexszel jelzett királis centrum abszolút konfigurációja S, és a 15-ös indexszel jelzett királis centrum abszolút konfigurációja R vagy S, előnyösen R.

5. Az 1. igénypont szerinti (VI) általános képletű aglükodalbaheptid, a képletben Y karboxil- vagy metoxi-karbonil-csoport, és a királis centrumok közül a 3-as indexű abszolút konfigurációja S és a 15-ös indexű abszolút konfigurációja R;

és gyógyászatilag elfogadható savakkal és bázisokkal képezett sóik, valamint belső sóik.

6. Eljárás (I) általános képletű aglükodalbaheptidek, a képletben

W és Z egymástól függetlenül a dalbaheptid csoportba tartozó

valamely antibiotikum aglikonjának relatív része;

Y karboxilcsoport vagy a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R és R_1 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy egy, az aminocsoportot védő csoport;

R_2 hidrogénatom,

és savval vagy bázissal képezett sóik, valamint belső sóik előállítására, azzal jellemezve, hogy



i) egy (IIb) általános képletű tetrapeptidet, a képletben

W és Z jelentése a fenti;

Y a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R₃ aminocsoport;

R₄ védett aminocsoport;

R₅ hidrogénatom;

egy N-védett fenil-alanin-származékkal kondenzálunk, majd a kapott pentapeptid fenil-alanin-részében levő aminocsoportról a védőcsoportot eltávolítjuk, így (III) általános képletű vegyülethez jutunk, a képletben

W és Z jelentése a fenti;

Y a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R₄ védett aminocsoport;

R₅ hidrogénatom;

ii) a (III) általános képletű pentapeptidet intramolekuláris kondenzációnak vetjük alá, majd a kapott hexapeptidben az R₄ védett aminocsoportról a védőcsoportot eltávolítjuk, így (IV) általános képletű vegyülethez jutunk, amelyben

W és Z jelentése a fenti;

Y a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R₄ aminocsoport,

iii) a (IV) általános képletű hexapeptidet egy N^α,N^ε-védett lizinszármazékkal kondenzáljuk, és ezt követően a kapott aglükodalbaheptid lizin molekuláris részében levő aminocsoportokról a védőcsoportokat eltávolítjuk, így (Ic) álta-

lános képletű aglükodalbaheptidet kapunk, a képletben

W és Z jelentése a fenti;

Y a karboxilcsoport valamely funkciós származéka;

R hidrogénatom;

R₁ hidrogénatom;

R₂ hidrogénatom;

iv) ha Y könnyen eltávolítható csoporttal védett karboxilcsoport, kívánt esetben az (Ic) általános képletű vegyület karboxilcsoportjának védőcsoportját eltávolítjuk, így a megfelelő, (Ic) általános képletű karboxi-származékot kapjuk;

v) abban az esetben, ha az (Ic) általános képletű vegyület W és Z molekularészeiben egyaránt tartalmaz védett fenolos vagy benziles hidroxilcsoportokat, kívánt esetben eltávolítjuk a hidroxilcsoportok védőcsoportjait;

vi) kívánt esetben az (Ic) általános képletű szabad vegyületet vagy annak megfelelő belső sóit savakkal vagy bázisokkal alkotott sókká alakítjuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, amelyben az i) lépésben az N-védett fenil-alanin-származék L-fenil-alanin-származék és az iii) lépésben az N^α,N^ε-védett lizin-származék D-lizin-származék.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti eljárás, amelyben a fenil-alanin-származék N-védőcsoportja olyan körülmények között távolítható el, amelyek az R₄ helyén álló védett aminocsoport védőcsoportjára nincsenek hatással.

9. A 6., 7. és 8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben a fenil-alanin-származék N-védőcsoportja



terc-butoxi-karbonil-amino-csoport és az R_4 védett aminocsoportban az N-védőcsoport benzil-oxi-karbonil-amino-csoport.

10. A 6., 7., 8. és 9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, amelyben az N-védett fenil-alanin-származékot és az N^α, N^ϵ -védett-lizin-származékot a karboxilcsoporton olyan csoportokkal aktiváljuk, amelyek peptid-kötések képzésére alkalmasak.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, amelyben a karboxilcsoportot aktiváló csoport az ilyen karboxilcsoportból és N-hidroxi-szukcinimidből képezett észter.

12. Az 1. igénypont szerinti aglükodalbaheptid gyógyszerként való alkalmazásra.

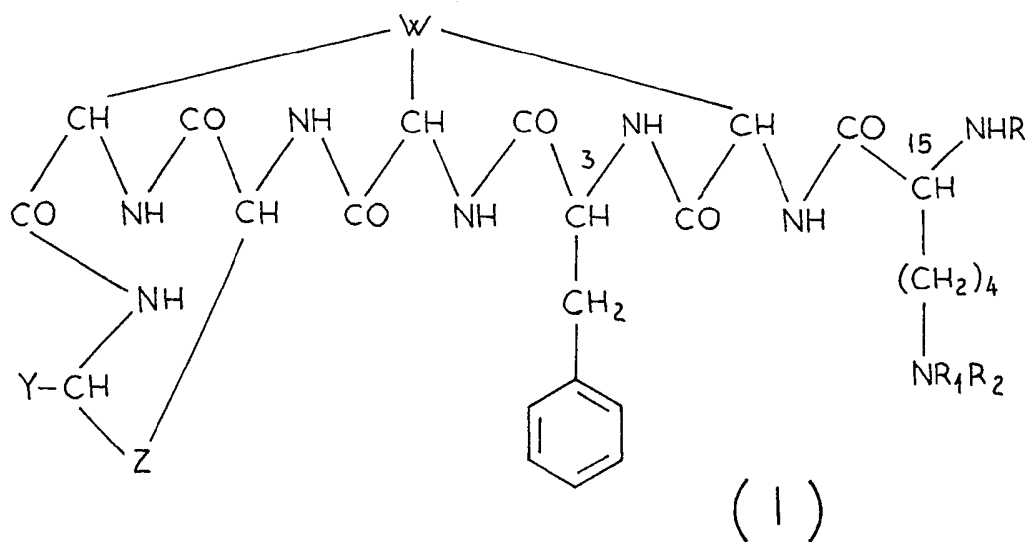
13. Az 1. igénypont szerinti aglükodalbaheptid alkalmazása antibiotikus hatású gyógyszer előállítására.

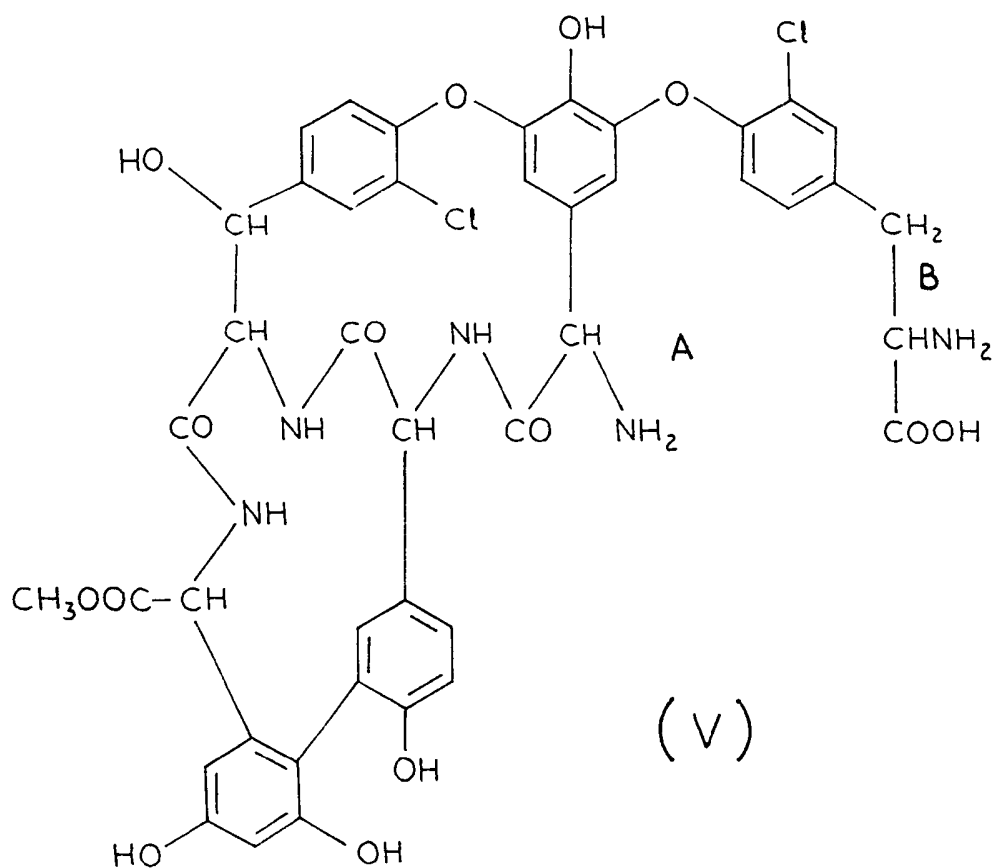
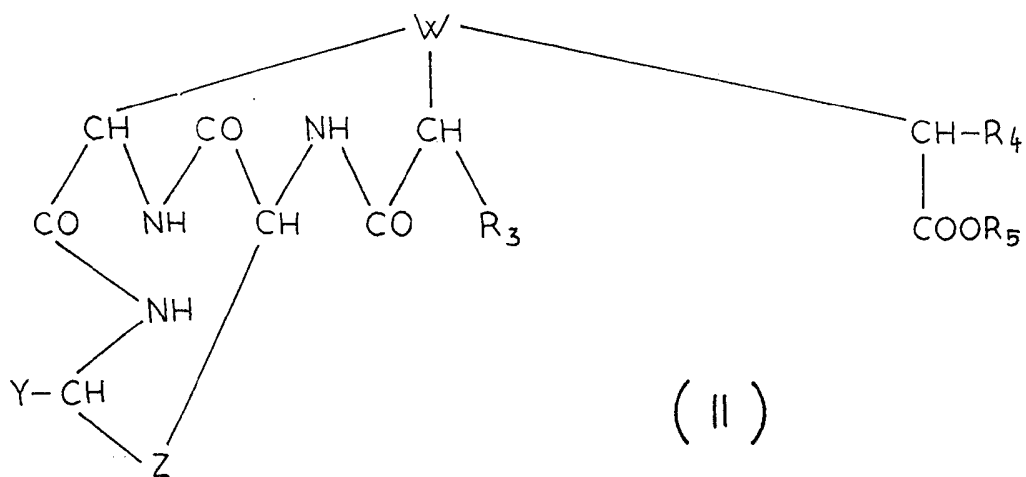
14. Gyógyászati készítmény, amely antibiotikus hatóanyagként aglükodalbaheptidet tartalmaz.

A meghatalmazott:

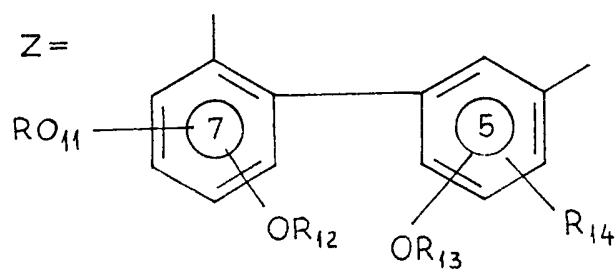
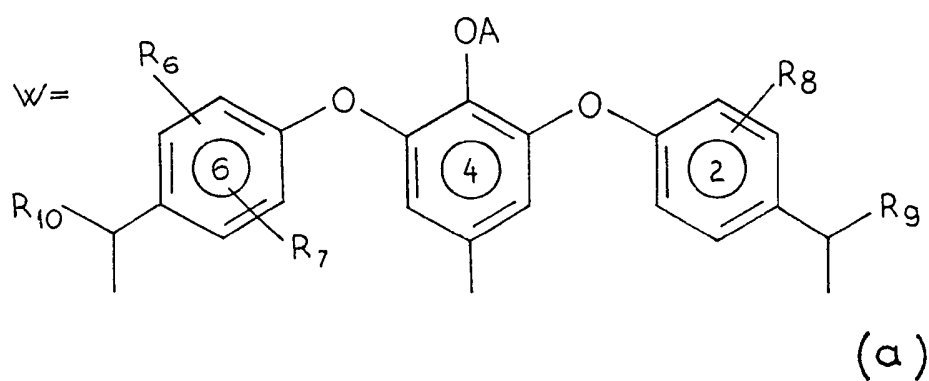
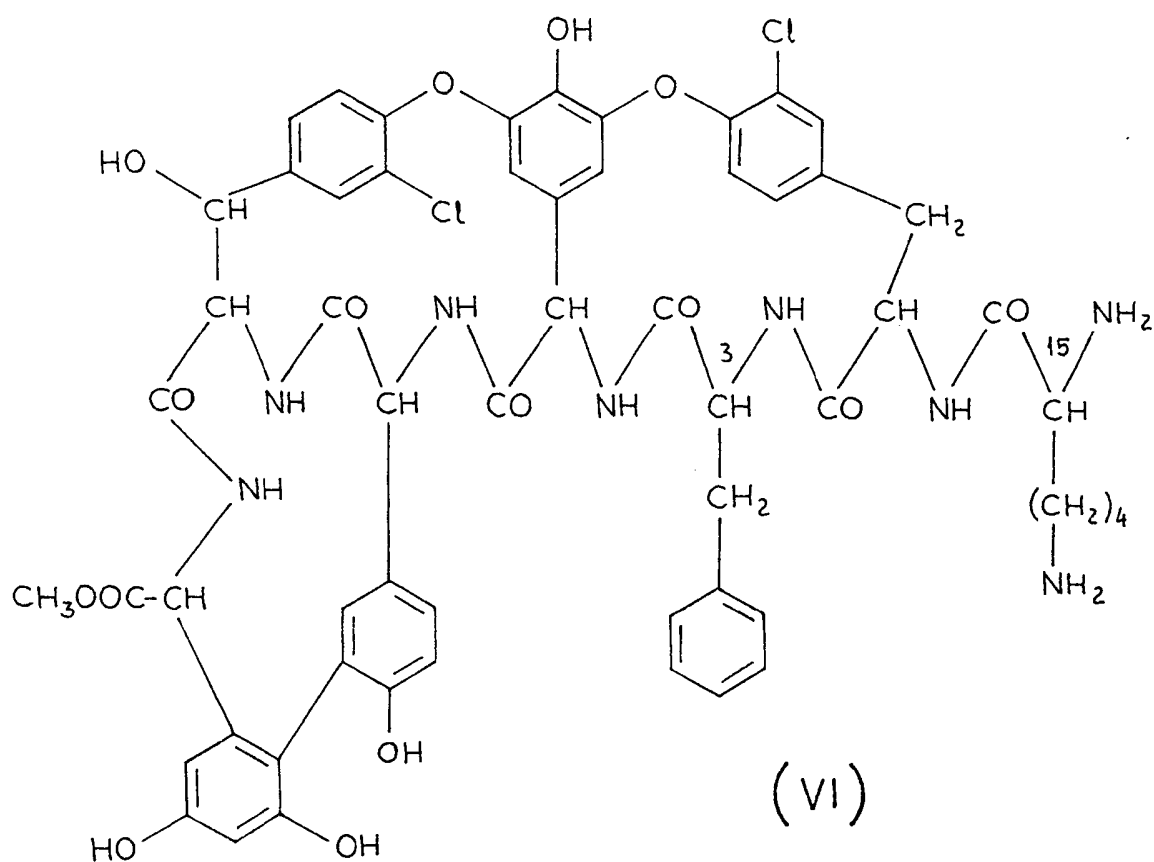
Derzsi Katalin
Szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

8. 002
Gwala





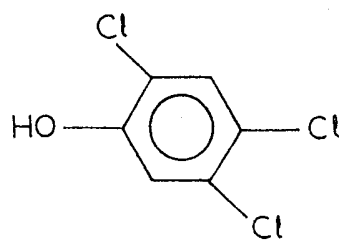
8/3



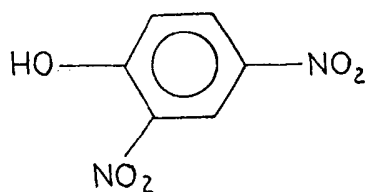
8/4



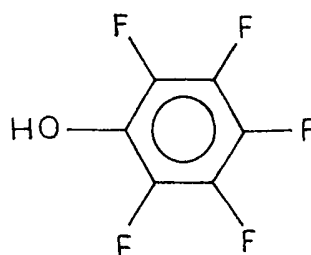
(c)



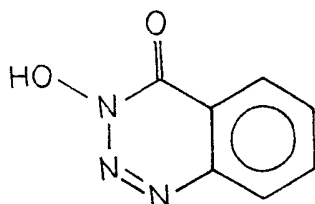
(d)



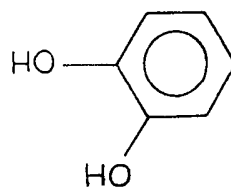
(e)



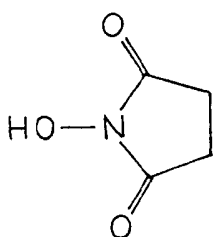
(f)



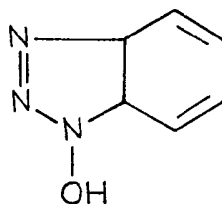
(g)



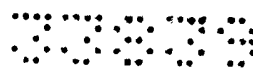
(h)



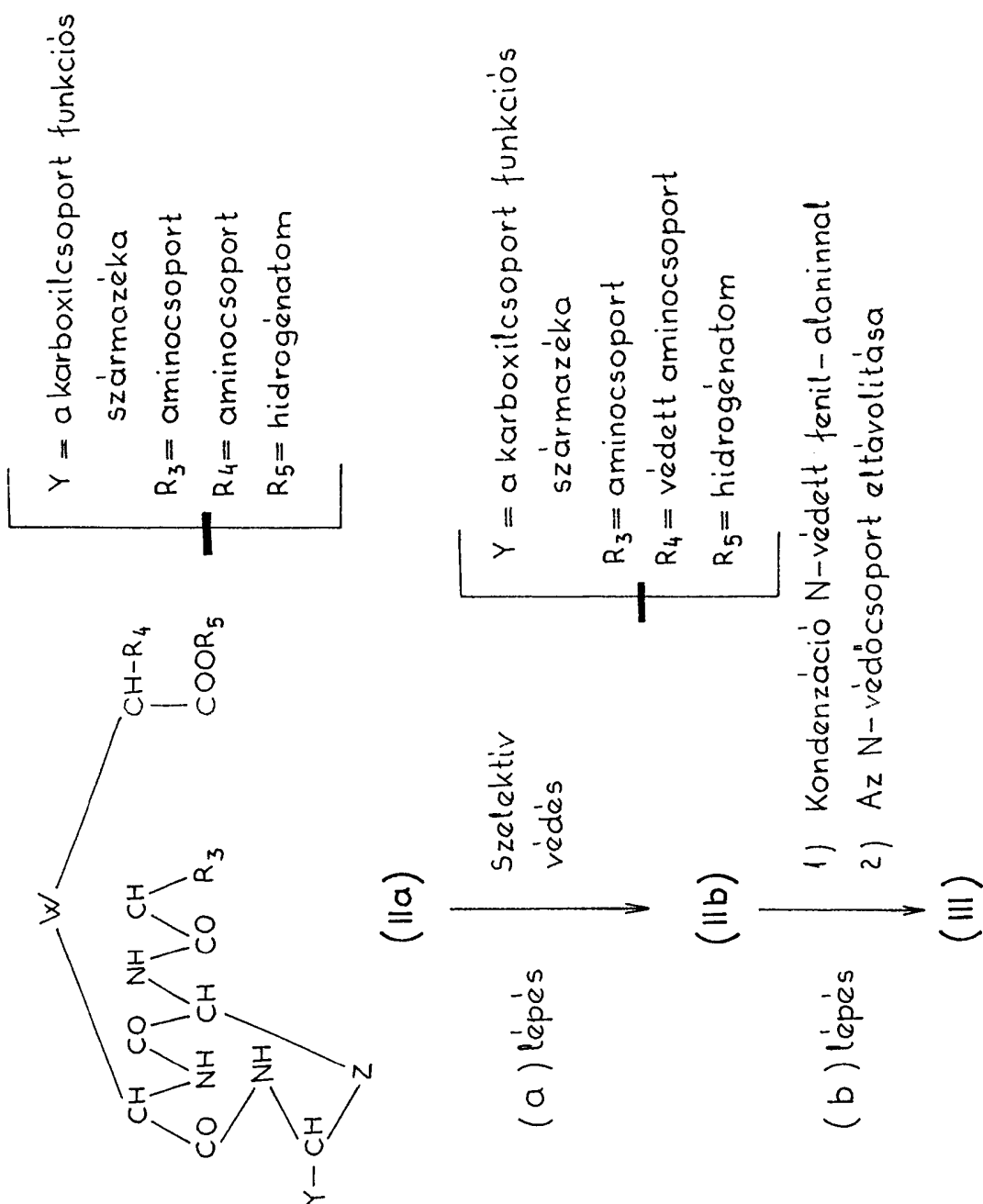
(i)



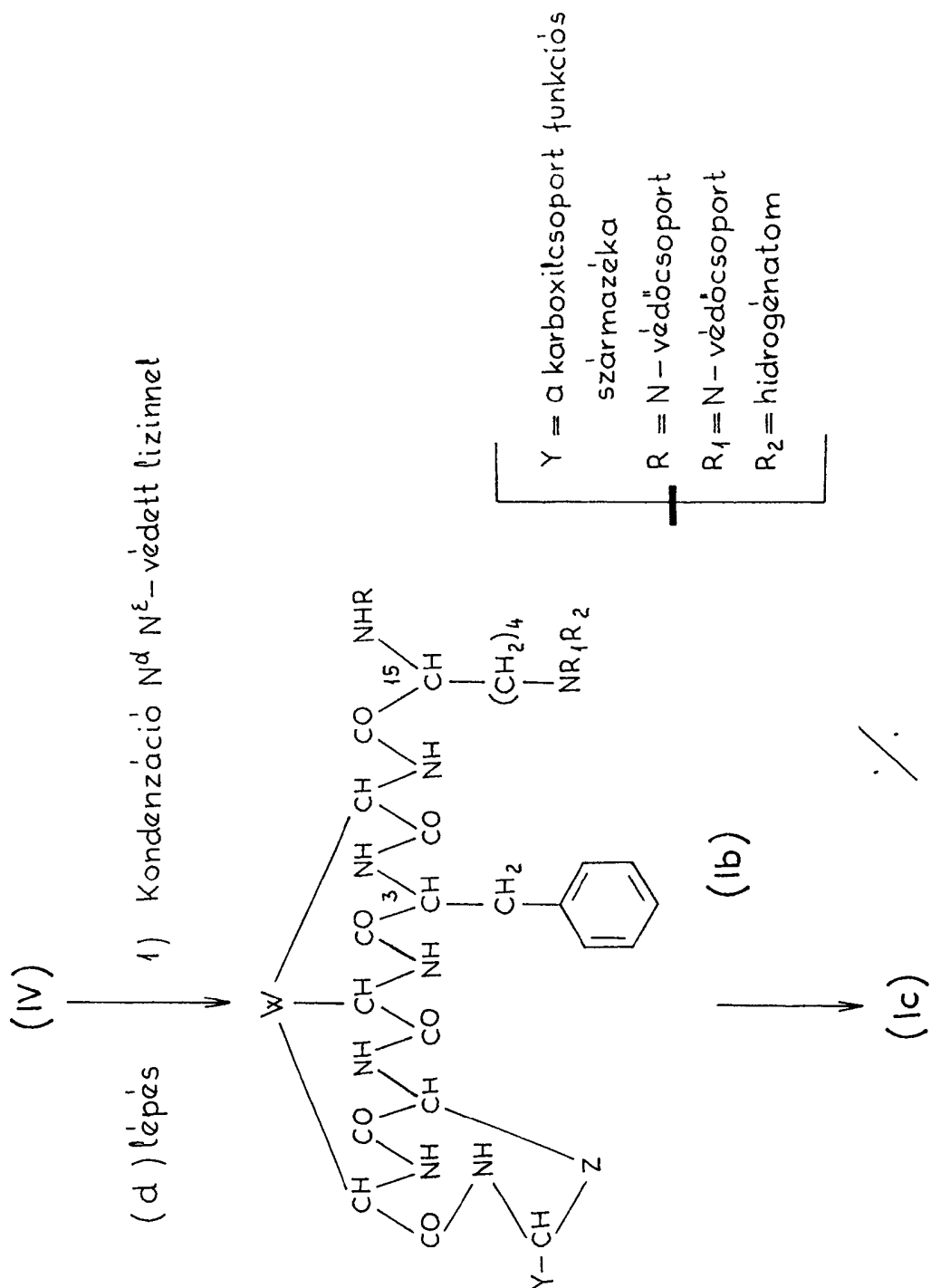
(j)



1. reakcióvázlat



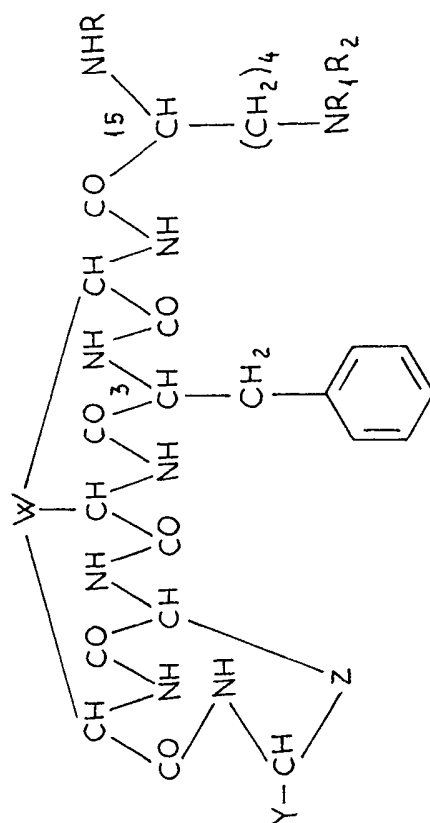
1. reakcióvázlat (folytatás 2)



1. reakcióvázlat (folytatás 3)

(1b)

- (a) lépés
- 1) Az N-védőcsoport eltávolítása
 - 2) A karboxilcsoport védőcsoportjának eltávolítása (adott esetben)



(1c)

Y = a karboxilcsoport funk-
ciós származéka vagy
karboxilcsoport

R = hidrogénatom

R₁ = hidrogénatom

R₂ = hidrogénatom