(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 830768 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 830768

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 5/04
C07C127/15

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.09.1982**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **08.03.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **08.03.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **03.09.1982 PCT/EP1982/000191**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.09.1981 DE P_3134923.4

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Stiftung Deutsches,** Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg BRD, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Eisenbrand, Gerhard,** TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)
2 • **Tang, Wei-ci,** TOWN UNKNOWN, KIINA, (CN)
3 • **Zelesny, Otto,** TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Ruska & Co Oy, Runeberginkatu 5, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
N-/N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso- karbamoyyli/-oligopeptidiesteri ja -amidi ja menetelmä niiden valmistavalmistamiseksi.
N-/N'-(2-kloretyl)-N'-nitroso- karbamoyl/- oligopeptidester och -amid och förfarande för dess framstäframställning.

Menetelmä N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-oligopeptidiestereiden tai -amidien valmistamiseksi

Viime vuosina on esitetty alkylanttien uusi aineluokka syövän kemoterapiaan, nimittäin nitrosovirtsa-aineet, esim. 1,3-bis-(2-kloorietyyli)-1-nitrosovirtsa-aine (BCNU), 1-(2-kloorietyyli)-3-sykloheksyyli-1-nitrosovirtsa-aine (CCNU) ja 1-(2-kloorietyyli)-3-(4-metyylisykloheksyyli)-1-nitrosovirtsa-aine (MeCCNU) (Proceeding of the 7th new drug seminar on the nitrosoureas, (Washington, D.C., Dec. 15-16, 1975), Cancer Treat. Rep., 60, 645-811 (1976)). Aineiden saamiseksi terapeuttisine luettelcineen viime aikoina on syntetisoitu joukko uusia nitrosovirtsa-aineita erilaisine substituentteineen, esim. sokerijohdannaisineen ja testattu kokeellisesti (Anderson et al., Cancer Res. 35, 761 (1976), Hayat et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 3, 217 (1979)).

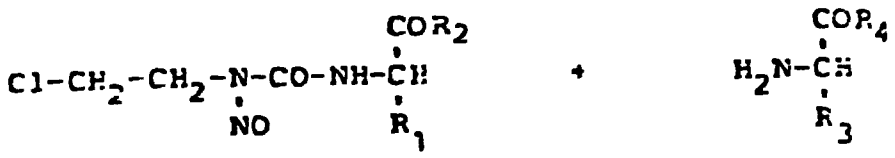
Tunnettujen nitrosovirtsa-aineiden haittana on kuitenkin ollut niiden alhainen aktiivisuus tai vakavat toksiset sivuvaikutukset.

Tämän keksinnön tarkoituksena onkin aikaansaada tehokkaampia ja myrkyttömämpiä nitrosovirtsa-aineita, erityisesti N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]johdannaisia.

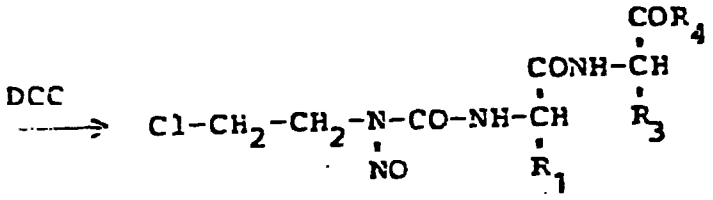
Keksinnön tarkoitus saavutetaan patenttivaatimuksessa esitetyin keinoin.

Päinvastoin kuin aikaisemmin syntetisoidut aineet, tässä tapauksessa on kysymys oligopeptidiestereistä, joiden aminoryhmässä on N-(2-kloorietyyli)-N-nitrosokarbamoyyliryhmä. N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso]karbamoyylioligopeptidiestereiden synteesin lähtöaineena käytetään N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso]karbamoyyliaminohappoja tai -oligopeptidejä, jotka puolestaan tarkoituksenmukaisesti on saatu N-(2-kloorietyyli)-N-nitrosokarbamoyyliatsidin reaktiolla aminohappojen tai oligopeptidien kanssa. Mainitut N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso]karbamoyyliaminohapot tai -oligopeptidit reagoivat amideiksi erityisesti sinänsä

tunnettujen peptidikatalyyttien, kuten esim. disykloheksyylikarbodi-imidin (DCC) vaikutuksen alaisena, niin että ne muodostavat toisen aminohapon tai toisen oligopeptidin esterin tai amidin kanssa peptidisidoksen. Reaktio voidaan esittää kaaviollisesti seuraavasti:



(I) (II)



(III)

Lähtöaineen I reaktio toisen aminohapon tai oligopeptidin II, jotka voivat olla samanlaisia tai erilaisia kuin ensimmäinen aminohappo tai ensimmäinen oligopeptidi, esterin tai amidin kanssa tapahtuu sopivimmin jäähdytyksen alaisena (noin 0°C), mutta myöskin pulmattomasti huoneen lämpötilassa. Esimerkiksi 1 mM N-(N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli)aminohappoa ja 1 mM aminohapon metyyliesteriä liuotetaan yhdessä 20 ml:an dikloorimetaania. Tähän liuokseen tiputetaan sekoittaen 1,1 mM (230 mg) disykloheksyylikarbodi-imidiä liuotettuna 10 ml:an dikloorimetaania. Sitten reaktioseosta sekoitetaan edelleen yhden tunnin ajan ja jätetään seisomaan yöksi huoneen lämpötilaan. N,N'-disykloheksyylivirtsa-aineen suodattamisen jälkeen suodos väkevöidään tyhjöä käyttäen. Tällöin saadaan raakatuote, joka puhdistetaan pylväskromatografisesti eet-

teri/dikloorimetaanilla erilaisissa seossuhteissa piimaan päällä. Eluution jälkeen yhdistetään pääjakeet ja väkevöidään tyhjöä käyttäen. Jäännös pannaan dikloorimetaaniin, sekoitetaan tarvittaessa n-pentaanin kanssa ja pannaan jääkaappiin kiteytymistä varten.

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on todettu olevan merkittävästi parempi aktiivisuus ja pienempi toksisuus kuin tunnetuilla samantyyppisillä yhdisteillä.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Vertailukoe I

Keksinnön mukaisten yhdisteiden vaikutus hiirileukemiaan L1210

Esimerkki-yhdiste		Parantumisten osuus	Ensimmäinen toksinen annos
10	100-200µmol/kg	> 50 %	400µmol/kg
11	100µmol/kg	> 50 %	400µmol/kg
12	200µmol/kg	> 50 %	800µmol/kg
13	100µmol/kg	> 50 %	400µmol/kg
15	400µmol/kg	> 50 %	800µmol/kg

Vertailukoe II

Keksinnön mukaisten yhdisteiden vertailu tunnettuihin yhdisteisiin

Tutkittiin eräiden 2-kloorietyylinitrosokarbamoyyli (CNC) -johdannaisten antileukeemista aktiivisuutta hiirileukemiaan L1210 ja rottaleukemiaan L5222. Yhdisteet annosteltiin 6 päivän kuluttua 10^6 solun inokuloimista kertaannoksena (i.p.) nostaen annosta logaritmisesti:

		Aktiivisuus L1210[1)]	Aktiivisuus L5222[1)]	Toksisuus[2)] (mg/kg)
Vertailuyhdiste I	CNC-GLY-GLY	+	+	ei tutk.
Vertailuyhdiste II	CNC-ALA-ALA	++	+	ei tutk.
Vertailuyhdiste III	CNC-GLY-LEU	++	ei tutk.	ei tutk.
Vertailuyhdiste IV	CNC-ALA-ALA-ALA	++	+	ei tutk.
Vertailuyhdiste V	CNC-GLY-NH_2	ei tutk.	ei tutk.	20,0
Esim.yhdiste 13	CNC-GLY-GLY-OCH_3	+++	+	44,2
Esim.yhdiste 10	CNC-GLY-GLY-NH_2	+++	++	44,2
Esim.yhdiste 11	CNC-ALA-ALA-NH_2	+++	++	44,2
Esim.yhdiste 12	CNC-GLY-GLY-GLY-NH_2	+++	ei tutk.	ei tutk.
Esim.yhdiste 15	CNC-GLY-GLY-TYR-NH_2	+++	ei tutk.	ei tutk.

1) Aktiivisuusarvostelu:

\+ ≥ 200 % T/C (T/C = käsiteltyjen eläinten elinajan pituuden suhde kontrollieläinten vastaavaan) tai erillisiä parantumisia

++ ≥ 50 % parantuneita yhdellä annoksella tai
≤ 50 % parantuneita useammalla annoksella

+++ ≥ 50 % parantuneita useammalla annoksella

2) Tarkoittaa ensimmäistä annosta, jolla letaalitoksisuutilmenee.

Esimerkki 1

N-[N'-(2-kloorietyyli)-nitrosoyyli)-nitroskarbamoyyli]-glysyyli-L-valiinimetyyliesteri

(R_1 = -H; R_3 = $-CH(CH_3)_2$)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso)karbamoyyli-glysiiniä] (1 nM) ja L-valiinimetyyliesteriä (1 nM) liuotetaan yhdessä 20 ml:aan dikloorimetaania. Tähän liuokseen tiputetaan sekoittaen disykloheksyyli-karbodi-imidiä (DCC; 1,1 nM) liuotettuna 10 ml:an dikloorimetaania. Sitten reaktioseosta sekoitetaan vielä yhden tunnin ajan ja annetaan seisoa yön yli. N,N'-disykloheksyyli-virtsa-aineen

suodatuksen jälkeen väkevöidään suodos pienempään tilaan tyhjöä käyttäen. Raakatuote puhdistetaan pylväskromatografisesti (piimaa, eluoitu eetteri/dikloorimetaanilla 1:10). Pääjakeista saadaan puhdas tuote liuottimen tyhjössä poistamisen jälkeen ja toistokiteyttämällä dikloorimetaani/n-pentaanista. Vaalean keltaisia neulasia, saanto: noin 70 %, sp. 97-98°C (haj.). Elementaarianalyysi: Laskettu C 40,94; H 5,93; N 17,36; saatu C 41,09; H 6,00; N 17,16. ^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi luonteenomaiset huiput kohdissa σ= 0,95 ppm (m, $-C(CH_3)_2$); σ = 2,20 ppm (m, -CH=); σ = 3,50 ppm (t, $Cl-CH_2-$); σ = 3,75 ppm (s, $-OCH_3$); σ = 4,20 ppm ($-N-CH_2-CO-$ ja $-CH_2-N-NO$); σ = 4,60 ppm (m, -N-CH-C-); σ = 6,70 ppm (d, -NH-); σ = 7,70 ppm (t, -NH-). Massaspektri ei osoittanut mitään merkkiä molekyylionista, mutta ilmaisee luonteenomaisia fragmentteja kohdissa M-107 ja M-108, jotka liittyvät $Cl(CH_2)_2-NNO$:n tai $Cl(CH_2)_2-N=NOH$:n lohkeamiseen.

Esimerkki 2

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-valyyli-L-valiinimetyyliesteri

($R_1 = R_3 = -CH(CH_3)_2$)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso-karbamoyyli]-L-valiinia (1 mM) ja L-valiinimetyyliesteriä (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Tuote kiteytyy dikloorimetaani/n-pentaanista vaalean keltaisina neulasina, saanto 65 %, sp. 125-126°C (haj.). Elementaarianalyysi: Laskettu: C 46,09; H 6,91; N 15,36; saatu C 46,31; H 7,10; N 15,23. ^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi luonteenomaiset huiput kohdissa: σ = 0,9-1, 1 ppm (m, $-C(CH_3)_2$); σ = 2,20 ppm (m, -CH =); σ = 3,50 ppm (t, $Cl-CH_2-$); σ = 3,75 ppm (s, $-OCH_3$); σ = 4,20 ppm (t, $-CH_2-N-NO$); σ = 4,50 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,60 ppm (d, -NH-); σ = 7,50 ppm (d, -NH-). Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 364 ja molekyylihuiput kohdissa m/e = 258 ja 257 (M-107 ja M-108). Molemmat viimeksi mainitut

huiput syntyvät Cl-CH_2-CH_2-N-NO:n tai Cl-CH_2-CH_2-N-NOH:n lohkeamisen vaikutuksesta, joko N-C-sidoksen yksinkertaisen lohkeamisen tai McLafferty-atominsiirron vaikutuksesta.

Esimerkki 3

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'- nitrosokarbamoyyli]-L-valyyli-L-metioniinimetyyliesteri
(R_1 = -$CH(CH_3)_2$; R_3 = -CH_2-CH_2-SCH_3)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso-karbamoyyli]-L-valiinia (1 mM) ja L-metioniinimetyyliesteriä (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Vaalean keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 70 %, sp. 81-82°C (haj.). Elementaarianalyysi: Laskettu C 42,37; H 6,35; N 14,12; saatu C 42,65; H 6,50; N 14,14. ^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat luonteenomaiset huiput kohdissa: σ = 1,00 ppm (m, -$C(CH_3)_2$); σ = 2,10 ppm (-CH_2-S-CH_3; -CH =); σ = 2,55 ppm (t, -CH_2-); σ = 3,50 ppm (t, Cl-CH_2-); σ = 3,80 ppm (s, -OCH_3); σ = 4,20 ppm (-CH_2-N-NO); σ = 4,40 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 4,80 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,80 ppm (d, -NH-); σ = 7,50 ppm (d, -NH-).

Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 396 ja huiput kohdissa m/e = 289 ja 288 (M-107 ja M-108).

Esimerkki 4

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-isoleusyyli-L-leusyyli-siinimetyyliesteri
(R_1 = -$CH(CH_3)CH_2CH_3$; R_3 = -CH_2-$CH(CH_3)_2$)

N-[N'-2-kloorietyyli)-N'-nitroso-karbamoyyli]-L-isoleusiinia (1 mM) ja L-leusiinimetyyliesteriä (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Vaalean kelataisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 60 %, sp. 128-129°C. Elementaarianalyysi: Laskettu: C 48,91; H 7,44; N 14,26; saatu: C 49,03; H 49,03; H 7,70; N 13,96. ^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat huiput kohdissa: σ = 1,00 ppm (-CH_3); σ = 1,25 - 2,00 ppm (-CH =; -CH_2-); σ = 3,50 ppm (t, Cl-CH_2-); σ = 3,80 ppm (s, -OCH_3); σ = 4,20 ppm (t, CH_2-N-NO); σ = 4,40 ppm

(m, -N-CH-CO); σ = 4,70 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,30 ppm (d, -NH-); σ = 7,45 ppm (d, -NH-). Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 393 ja huiput kohdissa m/s = 286, 285 (M-107, M 108).

Esimerkki 5

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-fenyylialanyyli-L-valiini-metyyliesteri

(R_1 = $-CH_2-C_6H_5$; R_3 = $-CH(CH_3)_2$)

N-(N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso)karbamoyyli-L-fenyylialaniinia (1 mM) ja valiinimetyyliesteriä (1 mM) käsiteltiin samoin kuin esimerkissä 1. Keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 60 %, sp. 107-108°C. Elementaarianalyysi: Laskettu C 52,36; H 6,10; N 13,57; saatu: C 52,54; H 6,21; N 13,28. ^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat huiput kohdissa: σ = 0,85 ppm (m, $-C(CH_3)_2$); σ = 2,10 ppm (m, -CH =); σ = 3,15 ppm (d, $-CH_2$-ph); σ = 3,40 ppm (t, Cl-CH_2-); σ = 370 ppm (s, $-OCH_3$); σ = 4,10 ppm (t, $-CH_2$-N-NO); σ = 4,45 ja 4,80 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,35 ppm (d, -NH-); σ = 7,25 ppm ($-C_6H_5$); σ = 7,55 ppm (d, -NH-). Massaspektri osoitti yhden molekyylihuipun kohdassa 412 ja huiput kohdissa m/e = 305, 304 (M-107, M-108).

Esimerkki 6

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-fenyyli-L-leusiinimetyyliesteri

(R_1 = $-CH_2-C_6H_5$; R_3 = $-CH_2-CH(CH_3)_2$)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso-karbamoyyli]-L-fenyylialaniinia (1 mM) ja L-leusiinimetyyliesteriä (1 mM) käsiteltiin samoin esimerkissä 1. Vaalean keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 60 %, sp. 96-96,5°C. Elementaarianalyysi: Laskettu: C 53,46; H 6,38; N 13,12; saatu: C 53,29; H 6,34; N 12,92.

^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi luonteenomaiset huiput kohdissa: σ = 0,90 ppm ($-C(CH_3)_2$); σ = 1,50 ppm (m, $-CH_2-CH$=); σ = 3,15 ppm (d, $-CH_2$-ph); σ = 3,45 ppm

(t, Cl-CH_2-); σ = 3,75 ppm (s, -OCH_3); σ = 4,10 ppm (t, -CH_2-N-NO); σ = 6,20 ppm (d, -NH-); σ = 7,30 ppm (-C_6H_5); σ = 7,50 ppm (d, -NH-).

Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 426 ja huiput kohdissa m/e = 319, 318 (M-107, M-108).

Esimerkki 7

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-fenyylialanyyli-L-fenyylialaniinimetyyliesteri

(R_1 = R_3 = -CH_2-C_6H_5)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-fenyylialaniinia (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Vaalean keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 60 %, sp. 116-117°C.

Elementaarianalyysi: Laskettu: C 57,33; H 5,47; N 12,16; saatu: C 57,22; H 5,23; N 12,12.

^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat huiput kohdissa: σ = 3,10 ppm (CH_2-ph); σ = 3,40 ppm (t, Cl-CH_2-N-NO); σ = 4,75 ppm (-N-CH-CO); σ = 6,10 ppm (d, - NH-); σ = 7,20 ppm (-C_6H_5); σ = 7,40 ppm (d, -NH-).

Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 460 ja huiput kohdissa m/e = 353, 352 (M-107, M-108).

Esimerkki 8

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitroso-karbamoyyli]-L-fenyylialanyyli-L-metioniinimetyyliesteri

(R_1 = -CH_2-C_6H_5); R_3 = CH_2-CH_2-SCH_3)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-fenyylialaniinia (1 mM) ja L-metioniinimetyyliesteriä (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Vaalean keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 70 %, sp. 74-75°C.

Elementaarianalyysi: Laskettu: C 48,59; H 5,66; N 12,59; saatu: C 48,69; H 5,67; N 12,41.

^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat luonteenomaiset huiput kohdissa: σ = 2,05 ppm (-CH_2-S-CH_3); σ = 2,45 ppm (-CH_2-); σ = 3,20 ppm (d, -CH_2-ph); σ = 3,45

ppm (t, Cl-CH_2-); σ = 3,75 ppm (s, -OCH_3); σ = 4,10 ppm (t, -CH_2-N-NO); σ = 4,65 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 4,80 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,50 ppm (d, -NH-); σ = 7,25 ppm (-C_6H_5); σ = 7,50 ppm (d, -NH-).

Massaspektri osoitti molekyylihuipun kohdassa 444 ja huiput kohdissa m/e = 337, 336 (M-107, M-108).

Esimerkki 9

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-metionyyli-L-fenyylialaniinimetyyliesteri

(R_1 = -CH_2-CH_2-SCH_3; R_3 = CH_2-C_6H_5)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-L-metioniiniä (1 mM) ja L-fenyylialaniinimetyyliesteriä (1 mM) käsitellään samoin kuin esimerkissä 1. Vaalean keltaisia neulasia (dikloorimetaani/n-pentaani), saanto noin 70 %, sp. 70-71°C.

Elementaarianalyysi: Laskettu: C 48,59; H 5,66; N 12,59; saatu: C 48,64; H 5,68; N 12,36.

^{1}H-NMR-spektroskooppinen tutkimus ilmaisi seuraavat huiput kohdissa: σ = 2,05-2,20 ppm (-CH_2-S-CH_3); σ = 2,65 ppm (t, -CH_2-); σ = 3,10 ppm (d, -CH_2 ph); σ = 3,45 ppm (t, -CH_2-N-NO); σ = 4,70 - 4,90 ppm (m, -N-CH-CO); σ = 6,80 ppm (d, -NH-); σ = 7,20 ppm (m, -C_6H_5); σ = 7,65 ppm (d, -NH-).

Massaspektri osoitti yhden molekyylihuipun kohdassa 444 ja huiput kohdissa m/e = 337, 336 (M-107, M-198).

Esimerkki 10

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysiiniamidi

(R = -H; R_3 = -H; R_4 = -NH_2)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysiiniä (1 mM) liuotetaan 10 ml:aan tetrahydrofuraania. Lisätään jäähdyttäen 1,1 mM karbonyylidi-imidatsolia.

Sekoitetaan tunti ja lisätään tipottain 1 mM glysiiniamidia (vapaa emäs) isopropanoliin liuotettuna.

Sekoitetaan yön yli, suodatetaan ja haihdutetaan suodos.

Tuote puhdistetaan ja erotetaan alipainepylväässä (silikageeli, dikloorimetaani/metanoli 9:1).

Poistamalla liuotin ja uudelleenkiteyttämällä etyyliformiaatti/petroolieetteristä saadaan puhdasta tuotetta.

Saanto n. 35 %, sp. 134°C

Elementaarianalyysi:

laskettu: C 31,63; H 4,51; N 26,36; Cl 13,37

saatu: C 31,44; H 4,39; N 25,95; Cl 13,57

^{1}H-NMR-spektri:

σ = 3,70 (t,Cl-CH_2); (-CH_2-CO-); σ = 3,95 (d, -CH_2CO-) σ = 4,10 (t, -CH_2NO-); σ = 7,15 (d, -NH_2); σ = 8,25 (t, CO-NH-); σ = 8,85 (t, CO-NH-)

Esimerkki 11

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]alanyyli-alaniiniamidi

(R_1 = -CH_3; R_3 = -CH_3; R_4 = -NH_2)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]alaniinia (1 mM) N-hydroksisuksiini-imidiä (1 mM) liuotetaan 10 ml:an tetrahydrofuraania. Tähän liuokseen tiputettiin kylmässä disykloheksyylikarbodi-imidiä (1,1 mM) tetrahydrofuraaniin (10 ml) liuotettuna.

Reaktioseosta sekoitetaan 2 tuntia. N,N'-disykloheksyylivirtsa-aine suodatetaan pois ja suodos sekoitetaan 5 ml:aan dikloorimetaania. Yön aikana kylmässä kiteytyy N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]alanyylihydroksisuksiini-imidiesteri liuoksesta. Saatu esteri (0,8 mM) liuotetaan 5 ml:aan asetonitriiliä ja sekoitetaan liuoksen kanssa, jossa on 0,1 mM alaniiniamidia (vapaa emäs) 2 ml:ssa vettä.

Sekoitetaan vielä 2 tuntia. Muodostunut sakka suodatetaan, kuivataan ja uudelleenkiteytetään etyyliformiaatti/petrolieetteristä, jolloin saadaan puhdasta tuotetta.

Saanto n. 50 %, sp. 153°C (haj.).

Elementaarianalyysi:
laskettu: C 36,80; H 5,49; N 23,84; Cl 12,70
saatu: C 36,95; H 5,70; N 23,89; Cl 12,23

Esimerkki 12

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-glysyyli-glysyyli-glysiiniamidi
(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = -Gly-NH_2)

Valmistetaan esimerkkiä 11 vastaavalla tavalla N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysiinistä, N-hydroksisuksiini-imidistä ja glysiiniamidista.

Saanto n. 25 %, sp. 160°C (haj.).

^{1}H-NMR-spektri:
σ = 3,60 ppm (d, N-CH_2); σ = 3,75 ppm (d, N-CH_2); σ = 3,95 (d, N-CH_2); σ = 3,55 ppm (t, -CH_2-); σ = 4,10 ppm (t, Cl-CH_2); σ = 7,15 (d, -NH_2); σ = 8,10 ppm (t, CO-NH); σ = 8,73 ppm (t, CONH); σ = 8,90 (t, CONH)

Elementaarianalyysi:
laskettu: C 33,48; H 4,65; N 26,04; Cl 11,00
saatu: C 33,68; H 4,77; N 25,99; Cl 10,89

Esimerkki 13

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysiinimetyyliesteri
(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = -OCH_3)

Valmistetaan esimerkkiä 1 vastaavalla tavalla N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysiinistä (1 mM) ja glysiinimetyyliesteristä (1 mM)

Puhdasta tuotetta saadaan uudelleenkiteyttämällä dikloorimetaani/petroolieetteristä.

Saanto n. 45 %, sp. 96°C.

Elementaarianalyysi:
laskettu: C 34,24; H 4,63; N 19,96; Cl 12,63
saatu: C 34,46; H 4,31; N 19,83; Cl 12,44

^{1}H-NMR-spektri:
σ = 3,60 (t, Cl-CH_2-); σ = 3,70 (s, -OCH_3); σ = 3,90 (2d, CH_2CO-); σ = 4,10 (t, CH_2NNO-); σ = 8,40 (t, CONH-); σ = 8,90 (t, CONH-)

Esimerkki 14

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli--glysyyli-glysyyli-fenyylialaniiniamidi
(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = -Gly-PheNH_2)

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]-glysyyli-glysiinihydroksisuksiini-imidiesteriä, joka on valmistettu esimerkkiä 11 vastaavalla tavalla, liuotetaan 20 ml:aan asetonitriiliä ja liuokseen sekoitetaan Gly-PheNH_2:n (1 mM) (vapaata emästä) vesiliuosta. Sekoitetaan kaksi tuntia ja haihdutetaan asetonitriili pois.

Jäljelle jäävästä vedestä erostuu vaaleankeltainen sakka, joka suodatetaan.

Uudelleenkiteyttämällä hieman lämmitetystä metanolista saadaan puhdasta tuotetta.

Saanto 65 %, sp. 200-201°C.

Elementaarianalyysi:

laskettu:	C: 46,01;	H: 5,14;	N: 20,8;	Cl: 7,54
saatu:	46,09;	H: 4,94;	N: 20,3;	7,73

Esimerkki 15

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli--glysyyli-tyrosiiniamidi
(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = -TyrNH_2)

Valmistetaan esimerkkiä 14 vastaavalla tavalla N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysyylihydroksisuksiini-imidiesteristä ja tyrosiiniamidista.

Saanto 60 %, sp. 109-110°C.

Elementaarianalyysi: (+ 1H_2O)

laskettu:	C: 43,00;	H: 5,18;	N: 18,8;	Cl: 7,93
saatu:	42,89;	4,91;	18,5;	8,30

Esimerkki 16

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli--glysyyli-leusyyli-metioniiniamidi

(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = -Leu-MethNH$_2$)

Valmistetaan esimerkkiä 14 vastaavalla tavalla N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysyylihydroksisuksiini-imidiesteristä ja Leu-MethNH$_2$:sta

Saanto 65 %, sp. 167-68°C.

Esimerkki 17

N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli--glysyyli-glysyyli-leusiiniamidi

(R_1 = -H; R_3 = -H; R_4 = Gly-Leu-NH$_2$)

Valmistetaan esimerkkiä 14 vastaavalla tavalla N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]glysyyli-glysyylihydroksisuksiini-imidiesteristä ja Gly-Leu-NH$_2$:sta.

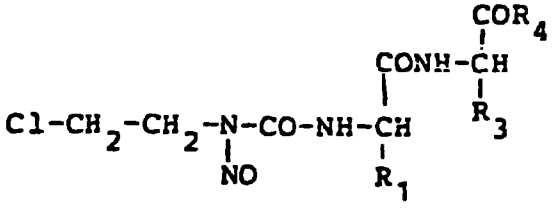
Saanto 60 %, sp. 140-41°C.

Elementaarianalyysi:

laskettu:	C 41,33;	H 6,01;	N 22,49
saatu:	41,27;	6,3 ;	22,33

Patenttivaatimus

Menetelmä farmakologisesti aktiivisten N-[N'-(2-kloorietyyli)-N'-nitrosokarbamoyyli]oligopeptidiestereiden tai -amidien valmistamiseksi, joilla on kaava III



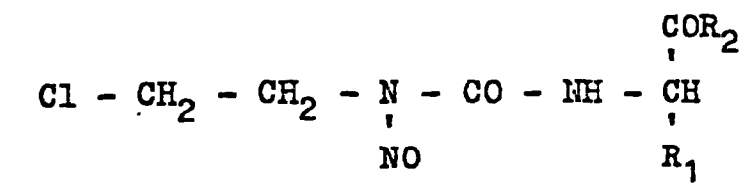
(III)

jossa

R_1 on ryhmä -H, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2-C_6H_5$, $-CH_2-(C_6H_4)-OH$, $-(CH_2)_4NH_2$ tai $-(CH_2)_3-NH-C(NH)-NH_2$,

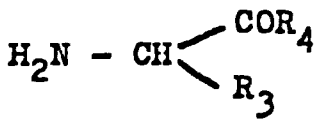
R_3 on ryhmä -H, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2-C_6H_5$, $-CH_2SH$, $-(CH_2)_4NH_2$ tai $CH_2-CH(CH_3)_2$ ja

R_4 on ryhmä $-OCH_3$, $-NH_2$ tai pääteaminoryhmän välityksellä peptidisesti sidottu glysiiniamidi, glysyyli-fenyylialaniiniamidi, tyrosiiniamidi, leusyyli-metioniiniamidi, glysyyli-leusiiniamidi, monolysiini-bis-oktalysiiniamidi, glysyyli-fenyylialanyyli-leusiiniamidi, glysyyli-fenyylialanyyli-metioniiniamidi tai fenyylialanyyli-fenyylialaniiniamidi, t u n n e t t u siitä, että kaavan I mukaisen yhdisteen



(I)

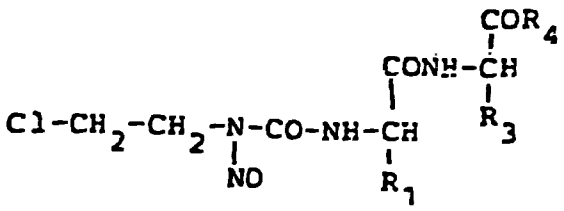
jossa R_1:llä on edellämainittu merkitys ja R_2 on ryhmä -OH tai $-NHCH_2COOH$, annetaan reagoida kaavan II mukaisen esterin tai amidin kanssa



(II)

Patentkrav

Förfarande för framställning av farmakologiskt aktiva N-[N'-(2-kloretyl)-N'-nitrosokarbamoyl] oligopeptidestrar eller -amider med formeln III



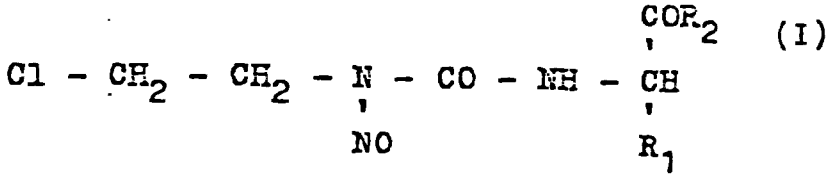
(III)

där

R_1 är en grupp -H, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2-C_6H_5$, $-CH_2(C_6H_4)-OH$, $-(CH_2)_4NH_2$ eller $-(CH_2)_3-NH-C(NH)-NH_2$,

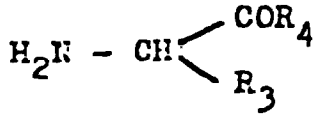
R_3 är en grupp -H, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2-C_6H_5$, $-CH_2SH$, $-(CH_2)_4NH_2$ eller $CH_2-CH(CH_3)_2$ och

R_4 är en grupp $-OCH_3$, $-NH_2$ eller en genom en ändaminogrupp peptidiskt bunden glysinamid, glysyl-fenylalaninamid, tyrosinamid, leusyl-mentioninamid, glysyl-leusinamid, monolysin-bis-oktalysinamid, glysyl-fenylalanyl-leusinamid, glysyl-fenylalanyl-mentioninamid eller fenylalanyl-fenylalaninamid, k ä n n e t e c k n a t därav, att en förening med formeln I



(I)

där R_1 har ovannämnda betydelse och R_2 är en grupp -OH eller-$NHCH_2COOH$, bringas att reagera med en ester eller en amid med formeln II



(II)

Hak.n:o 830768

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts vol. 85 (1976) 60508

Allekirjoitus