



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 82 11 06 (P. 238893)

Pierwszeństwo: 81 11 06 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 83 07 04

Opis patentowy opublikowano: 1987 02 20

Int. Cl.⁸ C07C 103/52

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Smithkline Beckman Corporation, Filadelfia
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowych tripeptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych tripeptydów, zawierających N-karbo-
ksyalkiloprolinę. Nowe związki mają strukturę
łańcucha tripeptydowego z dwoma końcowymi
jednostkami profilowymi oddzielonymi jednostka-
mi przestrzennymi. Jedna z jednostek profilowych
zawiera zasadniczy N-(grupa kwasowa alkilo)-pod-
stawnik.

Aktywność biologiczna związków wytworzonych
sposobem według wynalazku polega na zwiększa-
niu przepływu krwi nerkowej i indukowaniu
aktywności moczopędnej. Związki te są więc uży-
teczne do leczenia nadciśnienia lub poprawy dzia-
łania nerek.

K. T. Poroshin i współpracownicy w Chemical
Abstracts, 53, 21693h opisali użycie karbobenzoksy-
-L-prologlicylo-L-proliny jako substratu do wy-
tworzenia L-prologlicylo-L-proliny. Jednakże w
literaturze tej nie przedstawiono zasadniczego pod-
stawnika N-karboksyalkilowego, jak również oby-
dwu pośrednich jednostek charakterystycznych dla
budowy nowych związków. Poroshin nie wskazał
również aktywności biologicznej tych związków.

Europejski opis patentowy nr 12401 przedsta-
wia karboksyalkilodipeptydy, które stanowią enzy-
matyczne inhibitory przekształcania angiotensin.
Związki przedstawione w wymienionym europej-
skim opisie różnią się od nowych związków me-
chanizmem działania, jak również budową che-
miczną. Prolilowa jednostka dipeptydu, według

2

wymienionego patentu europejskiego, nie zawiera
podstawników N-karboksyalkilowych.

Jak stwierdzono powyżej, nowe związki wytwa-
rzane sposobem według wynalazku mają charak-
terystyczną budowę tripeptydów, które stanowią
prolilo-część przestrzenna-prolina z podstawnikiem
kwasowoalkilowym przy wolnym N-członie pierś-
cienia profilowego. Związki te zawierają więc dwie
grupy kwasowe, z których jedna jest amfote-
ryczna.

Sposobem według wynalazku wytwarza się zwią-
ki o wzorze 1, w którym R oznacza grupę kwa-
sową, taką jak karboksylowa o wzorze $-\text{CO}_2\text{H}$,
sulfonowa o wzorze $-\text{SO}_3\text{OH}$ lub fosfonowa o wzo-
rze $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, alk oznacza grupę alkilenową,
o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym, zawiera-
jącą 1-5 atomów węgla, za wyjątkiem etylden-
owej ($=\text{CH}-\text{CH}_2$), X oznacza atom O lub dwa
atomy H, H, Y oznacza atom H lub jeżeli X ozna-
cza atom H, H, wówczas Y oznacza grupę $-\text{OH}$,
linia przerywana oznacza ewentualnie wiązanie
węgiel-węgiel tylko gdy X i Y oznaczają atomy
H, H, lub atom H, n oznacza liczbę mianującą
się w zakresie 0-3 włącznie, a A oznacza prze-
strzenną resztę aminokwasową w połączonym
peptydzie, taką jak D- lub L-Ala o wzorze 5, D-
lub L-Phe o wzorze 6, D- lub L- β -metylo- β -Ala
o wzorze 7, D- lub L- β -fenylo- β -Ala o wzorze 8,
D- lub L- β -tienylo-Gly o wzorze 9, D- lub L-fe-
nylo-Gly o wzorze 10, D- lub L- β -Ala o wzorze

9, D- lub L-fenilo- β -Gly o wzorze 10, D- lub L- β -Ala o wzorze $\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—}$, kwas γ -aminomasłowy o wzorze $\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—}$ kwas D- lub L-2-aminomasłowy o wzorze 11, D- lub L-nor-Val o wzorze 12, D- lub L-norIleu o wzorze 13, kwas 3-amino-3-metylo-
masłowy o wzorze 14, 2-metylo-Ala o wzorze 15 albo ich N-metylowe pochodne wymienionych reszt przestrzennych.

Sposobem według wynalazku wytwarza się nowe związki na drodze reakcji związku o wzorze 2 ze związkiem o wzorze 3, w których to wzorach A, X, Y, linia przerywana oraz n mają wyżej podane znaczenie, R¹ oznacza ochronioną grupę karboksylową, sulfonową lub fosfonową, R² oznacza grupę ochronną funkcji karboksylowej, taką jak benzylowa lub niższa alkilowa, a R³ oznacza grupę aminową o wzorze —NH_2 lub N-metyloamino-
wą o wzorze 16.

Subgeneryczną grupę związków stanowią związki o wzorze 1, w którym A oznacza podstawioną lub niepodstawioną resztę β -Ala. Szczególnie użyteczne są związki o wzorze 1, w których R oznacza grupę karboksylową, alk oznacza grupę metylenową, X oznacza atomy H, H, Y oznacza atom H, n oznacza liczbę 0, a A oznacza resztę β -Ala. Korzystną konfiguracją reszt aminokwasowych każdej z wymienionych grup jest konfiguracja L. Szczególnie korzystnym związkiem wytwarzanym sposobem wg wynalazku jest siarczan N-karboksymetylo-L-prolino- β -alanylo-L-proliny.

W definicji związków o wzorze 1, reszty, w których X oznacza atom O stanowią pierścień piroglutamyłowy, reszty, w których Y oznacza grupę OH stanowią pierścień hydroksyprolinowy, a reszty, w których jest obecne podwójne wiązanie stanowią pierścień dehidroprolinowy. Wszystkie te związki są zasadniczo pochodnymi prolinowymi.

W nerkach psów uśpionych w zapisie prześwietlenia radiologicznego N-karboksymetylo-L-prolino-
-L-lizylo-L-prolina, N-karboksymetyloprolinoglicylo-L-prolina oraz N-(1-karboksyetylo)-L-prolino- β -alanylo-L-prolina były nieskuteczne jako czynniki rozszerzające naczynia nerkowe podczas badania radiologicznego. Stanowi to ilustrację krytycznego charakteru reszt przestrzennych oraz podstawnika N-alkilowego przy końcowej reszcie prolinowej.

Nowe związki obejmują różne farmakologicznie dopuszczalne sole wytworzone z nietoksycznych kwasów przy zasadowym N-członie reszty N-karboksyalkiloprolinowej lub z farmakologicznie dopuszczalnych kationów przy anionowej grupie kwasowej.

Przykładem ich są siarczany, chlorowodorki, fosforany, bromowodorki, etanodisulfoniany lub metanosulfoniany, a także sole sodowe, potasowe, wapniowe i podobne sole mocnych zasad. Sole metali alkalicznych są szczególnie użyteczne raczej jako półprodukty niż produkty końcowe, chociaż mogą być również stosowane w tej postaci.

Sole wytwarza się w reakcji związków o wzorze 1 w odpowiednim rozpuszczalniku z odpowiednim kwasem lub zasadą w znanych warunkach stosowanych w tej dziedzinie. Zazwyczaj nadmiar kwasu nieorganicznego lub zasady pod-

daje się reakcji ze związkiem wytwarzanym sposobem według wynalazku, rozpuszczonym w wodzie lub w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, takim jak wodny roztwór etanolu.

Nowe związki często tworzą solwaty, takie jak wodziany lub niższe alkoholany.

Sole addycyjne z kwasami, takie jak siarczany, są najbardziej użyteczną postacią macierzystych tripeptydów.

Ponadto dikwasy można stosować do wytwarzania proleków, w postaci amidów, pochodnych niższych estrów alkilowych o 1—5 atomach węgla w każdej z grup alkilowych lub estru benzylowego.

Sposób według wynalazku ilustruje schemat reakcji. We wzorach związków występujących w tym schemacie wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie.

Według wynalazku N-(grupa kwasowa alkilo)prolinę o wzorze 2 w postaci, w której łańcuch boczny grupy kwasowej jest ochroniony, poddaje się reakcji z dipeptydem zawierającym prolinę z ochronionymi końcowymi grupami kwasowymi o wzorze 3. W reakcji tej otrzymuje się produkt w postaci ochronionego kwasu dikarboksylowego o wzorze 4.

Podczas wytwarzania wiązania aminowego w reakcji aminokwasu oraz wyjściowego dipeptydu stosuje się warunki używane w reakcji sprzęgania peptydów. Korzystnie, reakcję aminokwasu o wzorze 2 z dipeptydem o wzorze 3 prowadzi się w obecności promotora acylowania, takiego jak karbodiimid, np. dicykloheksylokarbodiimid. Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku organicznym, np. tetrahydrofuranie, dimetyloacetamidzie lub dimetyloformamidzie, stosując aż do zakończenia reakcji temperatury umiarkowane. W wielu przypadkach stosuje się temperaturę pokojową w czasie 1—18 godzin.

Inne metody sprzęgania obejmują zastosowanie pochodnych izoksazolinowych, 1-etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinoliny, pochodnych fosfoniowych, pochodnych wodoru N-karboksylowego lub pochodnych estru N-hydroksysukcynimidu. Metody sprzęgania opisano bardziej szczegółowo w „Peptide Synthesis” przez Bodanszky, Willsy (1976 wydanie piąte).

Następnie, ochronne grupy estrowe wydziela się na drodze znanych reakcji, które nie mają wpływu na wiązanie amidowe. Odpowiednimi przykładami tych metod są katalityczne uwodornianie dla grup benzylowych albo alkaliczna hydroliza z użyciem wodorotlenku baru.

Alternatywnie, reagent dipeptydowy można wytworzyć z N-alkilokwasowej pochodnej proliny o wzorze 2 skondensowanej z resztami przestrzennymi A. Następnie dipeptyd poddaje się reakcji z proliną, której grupa karboksylowa jest ochroniona w postaci estru benzylowego lub niższego alkilowego. Grupy ochronne wydziela się następnie i ewentualnie wytwarza sole.

Związki te są również wytwarzane z użyciem zwykłych technologii stosowanych do wytwarzania peptydów.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują działanie farmakodynamiczne oraz

działanie na nerki i są użyteczne w farmacji. Stosuje się je szczególnie do zwiększenia przepływu krwi w nerkach i obniżania odporności naczyń nerkowych. Ich działanie poprawia pracę nerek i często kumuluje się. Nowe związki wykazują również działanie moczopędne. Z tego względu, związki wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują stosunkowo długie działanie przeciwnadciśnieniowe lub poprawiające funkcjonowanie nerek. Nieoczekiwanie, nowe związki są skuteczne przy podawaniu doustnym i pozajelitowym.

Aktywność biologiczną związków o wzorze 1 wykazano przez podawanie na drodze infuzji uspionym psom, którym mierzono obwodowe ciśnienie krwi, przepływ krwi w nerkach, odporność naczyń nerkowych oraz częstotliwość uderzeń serca według metod opisanych szczegółowo w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 197 297. Ogólnie, nowe związki obniżały odporność naczyń nerkowych i zwiększały przepływ krwi w nerkach w dawkach mieszczących się w zakresie 1/3—1/100 dawki dopaminy stosowanej w tym badaniu. Reprezentatywne wyniki tych badań podano w przykładach.

Alternatywnie, nowe związki wykazują biologiczną aktywność w samoistnym nadciśnieniu u szczurów (SHR). W badaniu tym szczury w wieku 16—19 tygodni, rodzaju Okamoto-Aoki po południowym podaniu pierwszej dawki doustnie w ilości 25 ml/kg wykazały samoistne nadciśnienie. Następnie, zwierzęta umieszczano w klatkach metabolicznych i w czasie 3 godzin analizowano zbierany mocz.

Za pomocą obejmującej ogonowej mierzono pośrednie, skurczowe ciśnienie krwi oraz częstotliwość bicia serca. Podawano taką samą drugą dawkę badanego związku. Po 2 godzinach powtórnie badano ciśnienie krwi oraz częstotliwość bicia serca. Badane związki podawano doustnie i pozajelitowo w solance z dodatkiem 0,02% kwasu askorbinowego. W teście tym wykazano aktywność moczopędną reprezentatywnych związków wytwarzanych sposobem według wynalazku.

Na przykład, półsiarczan (N-karboksymetylo)-L-prolino-β-alanylo-L-proliny w dawce pozajelitowej wykazał wzrost wydzielania Na^+ , K^+ w dawce 25 i 50 mg/kg. U uspionych psów RVR—ED₁₆ wynosiło 12 μ/kg dla porównania wielkości dawki dopaminy wynosiła 3,5 μ/kg. Nie stwierdzono aktywności enzymatycznej inhibitującej konwersję angiotensyny przy 10-krotnej dawce efektywnej nerkowo. Ta właściwość również nie stymuluje lub antagonizuje in vitro cyklazowego układu dopamina—adenylan jak również nie wykazuje aktywności w anty-próbie ADH pęcherza moczowego. Nowe związki wykazują słabe działanie zwalniające czynności serca.

Nowe związki podaje się w jednostkach dawkowych, takich jak kapsułki, tabletki, preparaty iniekcyjne stosowane do poprawienia działania nerek, leczenia wysokiego ciśnienia krwi oraz indukowania diurezy. Farmakologiczne nośniki do wytwarzania dawek jednostkowych stosuje się w postaci stałej i ciekłej. Przykładem nośników stałych jest laktoza, guma arabska, sacharoza, talk,

żelatyna, agar, pektyna, siarczan wapnia, stearynian magnezu lub kwas stearynowy. Przykładem nośników ciekłych jest syrop, olej z orzeszków ziemnych, olej z oliwek lub woda. Nośniki lub rozcieńczalniki mogą obejmować znane substancje opóźniające działanie, takie jak monostearynian glicerolu lub distearynian glicerolu sam lub z woskiem.

Powstrzymanie wydzielania produktu końcowego jak również pochodnych, które mogą być stopniowo wchłaniane, powoduje to, że substancja aktywna może działać w sposób przedłużony nadając nowym związkom unikalną aktywność biologiczną.

Można stosować nowe związki w postaci różnorodnych form farmaceutycznych. Do podawania doustnego, przy użyciu stałych nośników, stosuje się preparaty w postaci tabletek, proszku umieszczonego w żelatynowych kapsułkach, drażetek uwalniających regularnie składnik czynny lub uwalniających składnik czynny stopniowo, kołaczyków, pastylek romboidalnego kształtu. Stały nośnik stosuje się w ilości mieszczącej się w szerokim zakresie, korzystnie od około 25 mg do 1 g. W przypadku stosowania nośników ciekłych, wytwarza się preparaty w postaci syropu, emulsji, miękkich kapsulek żelatynowych, sterylnych płynów do iniekcji umieszczonych w ampułkach, albo wodnych lub bezwodnych zawiesin.

Preparaty farmaceutyczne wytwarza się znany mi w dziedzinie farmacji technologiami, obejmującymi mieszanie, granulowanie i sprasowywanie podczas wytwarzania tabletek, albo mieszanie, napełnienie i rozpuszczanie składników z wytworzeniemżądanego pozajelitowego produktu końcowego.

Dawki nowego związku w środku farmaceutycznym stanowią skuteczne, nietoksyczne ilości aktywnego tripeptydu mieszczące się w zakresie 10—350 mg, korzystnie 50—200 mg. Dobraną dawkę podaje się pacjentowi poddawanemu leczeniu w zależności od potrzeb 1—5 razy dziennie doustnie, przez iniekcję lub infuzję. Stosowanie pozajelitowe wymaga doboru mniejszej dawki z wymienionego zakresu, indywidualnie lub w kombinacji. Jednakże korzystnie stosuje się doustnie 1—5 krotne podawanie większych dawek w ciągu dnia w zależności od pacjenta.

Jak stwierdzono wyżej związki wytwarzane sposobem według wynalazku mogą występować w różnych konfiguracjach, takich jak izomery optycznie czynne lub ich mieszaniny. Związki izomeryczne wytwarza się łatwo przez podstawienie aminokwasu o wybranej konfiguracji do reakcji chemicznych albo przez rozdział chromatograficzny mieszaniny izomerów na drodze wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.

Poniższe przykłady ilustrują przedmiot wynalazku, nie ograniczając, jego zakresu. Wszystkie wartości temperatury wyrażano w °C.

Przykład I. Mieszaninę 6,0 g (0,025 m) estru benzyloвого L-proliny, 4,7 g (0,025 m) N-tert-butoksykarbonylo-L-alaniny, 6,75 g (0,05 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 3,2 ml (2,82 g, 0,025 m) N-etylmorfolinę oraz 85 ml suchego tetrahydrofuranu

chłodzi się, sączy i dodaje do mieszaniny 5,15 g (0,025 m) dicykloheksylokarbodiimidu oraz 10 ml tetrahydrofuranu. Mieszaninę miesza się w temperaturze 0°C w czasie 30 minut, po czym w temperaturze 25°C w czasie 18 h. Mieszaninę realsacyjną sączy się. Przesącz odparowuje się, otrzymując pozostałość, którą rozpuszcza się w octanie etylu. Roztwór przemywa się 1–10% kwasem octowym, wodą, 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu i zateża. Otrzymuje się 9,8 g surowego estru benzyloвого N-tert-butoksykarbonylo-L-alanylo-L-proliny.

Mieszaninę 2 g wytworzonego estru benzylowego, 3,0 g kwasu trifluorooctowego oraz 15 ml suchego chlorku metylenu pozostawia się do prze-reagowania w temperaturze pokojowej w czasie 2 godzin, po czym odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surową sól trifluorooctową. Sól rozpuszcza się w eterze i zakwasza eterowym roztworem chlorowodoru. Otrzymuje się 1,15 g chlorowodoru estru benzyloвого L-alanylo-L-proliny w postaci stałej barwy białej o temperaturze topnienia 162–164°C.

Okolo 500 g 10% palladu na węglu drzewnym zwilża się wodą i dodaje do roztworu 16,5 g (0,06 m) estru benzyloвого N-karbometoksymetylo-L-proliny [R. Adarus, J. Am. Chem. Soc. 81 5803 (1959)] i 50 ml etanolu. Po wstrząsaniu w atmosferze wodoru pod obniżonym ciśnieniem w czasie 2 godzin, mieszaninę sączy się. Przesącz odparowuje się. Po dodaniu etanolu i odparowaniu, pozostałość w postaci syropu rozpuszcza się w toluenie-eterze (1:1) i zakwasza zimnym eterowym roztworem chlorowodoru. Wytworzoną substancję stałą barwy białej oddziela się i przemywa eterem. Otrzymuje się 13,8 g surowego chlorowodoru N-karbometoksymetylo-L-proliny o temperaturze topnienia 191–193°C.

Mieszaninę 2,23 g (0,01 m) chlorowodoru N-karbometoksymetylo-L-proliny, 3,13 g (0,01 mola) chlorowodoru estru benzyloвого L-alanylo-L-proliny, 2,70 g (0,02 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 2,3 g (0,02 m) N-etylomorfoliny oraz 40 ml suchego tetrahydrofuranu chłodzi się w wodzie z lodem, po czym poddaje reakcji z 2,06 g (0,01 m) dicykloheksylokarbodiimidu w temperaturze pokojowej w czasie 17 godzin. Substancję stałą oddziela się przez sączenie. Przesącz rozcieńcza się octanem etylu i przemywa 3 krotnie 50 ml 1,5% kwasu octowego, wodą, 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Osuszoną warstwę organiczną odparowuje się z uzyskaniem 4,3 g syropu barwy żółtej. Wytworzony syrop wprowadza się na kolumnę z żelą krzemionkowym i eluuje chlorkiem metylenu, 1% metanolem/chlorkiem metylenu oraz 1–1/2% metanolem/chlorkiem metylenu. Otrzymuje się 2,1 g (47%) estru benzyloвого N-karbometoksymetylo-L-proliny-L-alanyloproliny jako pro-leku żadanego produktu końcowego.

Do 30 ml dodaje się 2,1 g otrzymanej substancji, po czym całość dodaje się do mieszaniny 5,0 g wodzianu wodorotlenku baru w 40 ml wody. Po mieszanii w czasie 4 godzin, przez mieszaninę przepuszcza się gazowy dwutlenek węgla. Wytrą-

cony bezbarwny węglanu baru odsącza się, otrzymując 1,25 g (78%) żadanego tripeptydu w postaci stałej barwy białej.

Po rekryształizacji z mieszaniny metanol/octan etylu próbka 300 g dała substancję stałą barwy białej o temperaturze topnienia 270°C (rozkład), która stanowi sól barową.

W wodzie rozpuszcza się 0,9 g nieoczyszczonej substancji stałej. Mieszaninę przesącza się. Przesącz zakwasza rozcieńczonym kwasem siarkowym do wartości pH 3,5. Siarczan baru wydziela się przez sączenie. Przesącz odparowuje się, otrzymując siarczan N-karboksymetylo-L-proliny-L-alanylo-L-proliny w temperaturze topnienia 190–196°C z rozkładem.

Analiza elementarna:

Obliczono dla $C_{15}H_{23}N_5O_8 \cdot 1/4 H_2SO_4 \cdot 1/2 H_2O$:

48,06C; 6,59H; 11,20N

Znaleziono: 48,48 i 48,21C; 6,69 i 6,78H; 10,80 i 10,79N. $[\alpha]^{25}_D$ (C, 1,1:1 $CH_3OH \cdot H_2O$) — 132,2°.

W badaniach 3 uspiionych psów sól barowa w dawce 30 $\mu g/kg$ minutę dała 21,7% wzrost przepływu krwi nerkowej oraz 15% zmniejszenie odporności naczyń nerkowych.

Przykład II. Mieszaninę 6,0 g (0,025 m) chlorowodoru estru benzyloвого L-proliny, 6,75 g (0,05 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 3,2 ml (0,025 m) N-etylomorfoliny, 6,63 g (0,025 m) L-tert-butoksykarbonylofenyloalaniny, 5,15 g (0,025 m) dicykloheksylokarbodiimidu oraz 35 ml suchego tetrahydrofuranu miesza się krótko w temperaturze 0°C, po czym 4 godziny w temperaturze 25°C. Ług macierzysty oddziela się i odparowuje. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i rozcieńczonym kwasie solnym. Warstwy rozdziela się. Warstwę wodną ekstrahuje się octanem etylu.

Połączone warstwy organiczne przemywa się rozcieńczonym kwasem solnym, wodą, 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Warstwy organiczne rozdziela się i odparowuje. Dtrzymuje się 10,3 g (91%) estru benzyloвого N-tert-butoksykarbonylo-L-fenyloalanylo-L-proliny.

Następnie 7,0 g otrzymanego estru poddaje się reakcji z 10 ml kwasu trifluorooctowego, 40 ml suchego chlorku metylenu oraz 4 ml 1,3-dimetyloksybenzenu w temperaturze 25°C w czasie 2 godzin i postępując w sposób opisany powyżej wytwarza się 5,57 g chlorowodoru estru benzylowego L-fenyloalanylo-L-proliny.

Ester benzylovery w ilości 2,23 g (0,01 m) poddaje się reakcji z 3,89 g chlorowodoru N-karbometoksymetylo-L-proliny, 2,70 g (0,02 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 4,0 ml N-etylomorfoliny, 2,06 g (0,01 m) dicykloheksylokarbodiimidu oraz 40 ml suchego tetrahydrofuranu w temperaturze 25°C w czasie 17 godzin w sposób opisany powyżej. Otrzymuje się 2,9 g estru benzyloвого N-karbometoksymetylo-L-proliny-L-fenyloalanylo-L-proliny oczyszczonego na żelu krzemionkowym.

W 30 ml metanolu rozpuszcza się 1,1 g (2,1 mm) pro-leku, diestru i poddaje reakcji w ciepłym roztworze 5,0 g wodorotlenku baru w 40 ml wody. Mieszaninę miesza się w temperaturze 25°C w czasie 4 godzin, po czym dodaje nadmiar dwu-

tlenku węgla. Węgiel baru wydziela się przez sączenie z użyciem filtra pomocniczego. Przesącz odparowuje się, a pozostałość azeotropuje z etanolem, jak opisano powyżej. Otrzymuje się 0,72 g (82%) soli barowej, a następnie 0,89 g półsiarczamu N-karboksymetylo-L-proliło-L-fenylalaniny o temperaturze topnienia 145—148°C.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{21}H_{25}N_3O_6 \cdot 1/2 \cdot Ba \cdot H_2O$:

51,15 C; 5,31 H; 8,52 N; 13,92 Ba.

Znaleziono: 51,47, 51,64 C; 5,27, 5,50 H; 5,28, 5,28 N; 12,60 Ba $[\alpha]^{25}_D = (C, 1, H_2O) - 43,9^\circ$.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{21}H_{25}N_3O_6 \cdot 1/2 H_2SO_4$:

54,07 C; 6,04 H; 9,01 N.

Znaleziono: 53,71, 53,64 C; 5,90, 5,94 H; 8,82, 8,91 N.

Otrzymany siarczan w dawce 30 i 300 $\mu\text{g/kg/min}$ wykazał działanie zwiększające przepływ krwi nerkowej. Sól barowa okazała się nieaktywna w badaniach prowadzonych na uśpionych psach.

Przykład III. Postępując w sposób analogiczny do opisanego powyżej na drodze acylowania z użyciem dicykloheksylokarbodiimidu wytwarza się 7,6 g estru benzylowego N-tert-butoksykarbonylo- β -alanylo-L-proliny. Grupę ochronną wydziela się z użyciem kwasu trifluorooctowego. Otrzymuje się chlorowodórek estru benzylowego β -alanylo-L-proliny. Związek ten w ilości 6,39 g (0,02 m) kondensuje się z 2,23 g (0,01 m) chlorowodoru N-karbometoksymetyloproliny prowadząc reakcję w obecności 2,7 g (0,02 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 12 ml N-etylomorfoliny, 2,06 g (0,01 m) dicykloheksylokarbodiimidu w 50 ml suchego tetrahydrofuranu w temperaturze pokojowej w czasie 17 godzin. Otrzymuje się 1,9 g estru benzylowego N-karbometoksymetylo-L-proliło- β -alanylo-L-proliny w postaci syropu, stanowiącego prekursor pro-lekużądanego dikwasu.

Diester w ilości 1,75 g (3,9 m) hydrolizuje się z użyciem wodorotlenku baru i metanolu; po czym zadaje kwasem siarkowym. Otrzymuje się 1,2 g siarczamu N-karboksymetylo-L-proliło- β -alanylo-L-proliny w postaci stałej barwy białej.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{15}H_{19}N_3O_6 \cdot 1/2 H_2SO_4$: 46,15 C; 6,20 H 10,76 N,

Znaleziono: 45,81 C; 46,14 C; 6,50, 6,52 H; 9,94, 10,22 N; $[\alpha]^{25}_D = (0,8, H_2O) - 70,4^\circ$.

Test samoistnego nadciśnienia u 3 badanych szczurów pozajelitowo wykazał działanie przy dawce 25 mg/kg. Próba moczośredna wykazała: Na^+ 676,04 (kontrolna 126,76); K^+ 242,53 (kontrolna 85,12), ilość moczu 16 ml/szczura (kontrolna 3). Stwierdzono równocześnie wzrost przepływu krwi nerkowej i obniżenie odporności naczyń nerkowych w badaniach u 2 uśpionych psów w dawkach 3,30 i 300 $\mu\text{g/kg/min}$. W drugorzędowych testach u 3 psów związek ten przy podaniu dożylnym wykazał wartość ED_{50} wynoszącą 12 $\mu\text{g/kg}$ dla porównania dopamina — 3,5 $\mu\text{g/kg}$.

Przykład IV. Postępując w sposób analogiczny do opisanego powyżej z 7,23 (0,03 m) β -bromopropionianu etylu i 7,33 g (0,04 m) chlorowodoru estru benzylowego proliny otrzymano 4,6 g (50,2%) estru benzylowego N-(2-karboeto-

ksy)etylo-L-proliny. Otrzymany związek 4,6 g (0,015 m) poddano uwodornieniu nad palladem na węglu. Otrzymano 2,96 g (70%) chlorowodoru N-(2-karboetoksy)etylo-L-proliny o temperaturze topnienia 160—171°. Związek ten w ilości 2,42 g (0,0096 m) poddano kondensacji z 2,25 g (0,0072 m) chlorowodoru estru benzylowego L-alanylo-L-proliny w dicykloheksylokarbodiimidzie. Otrzymuje się 0,8 g estru benzylowego N-(2-karboetoksy)etylo-L-proliło-L-alanylo-L-proliny. Prekursor proleku hydrolizowano wodorotlenkiem baru w wodnym roztworze metanolu. Otrzymano 0,498 g (64%) N-(2-karboksyetylo)-L-proliło-L-alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 133—136°.

Analiza elementarna dla $C_{16}H_{23}N_3O_6 \cdot C_2H_5OH \cdot 1H_2O$: 51,54 C; 7,93 H; 10,02 N. Obliczono: 51,95, 51,72 C; 7,12, 7,32 H; 10,19, 10,04 N. $[\alpha]^{25}_D = (1H_2O) - 147,3^\circ$.

Związek ten u 2 uśpionych psów wykazał kumulacyjny efekt działania przy dawce 300 $\mu\text{g/kg/min}$ z 34% wzrostem przepływu krwi nerkowej i 23% obniżeniem odporności naczyń nerkowych.

Przykład V. Wytworzony w sposób opisany w przykładzie I, chlorowodórek estru benzylowego D,L- β -metylo- β -alanylo-L-proliny w ilości 5,95 g (0,027 m) poddaje się reakcji z 4,41 g (0,015 m) chlorowodoru L-N-[5-(karbometoksy)pentyl]proliny, otrzymanego w reakcji 6-bromokapronianu etylu z proliną. Następnie chlorowodórek estru benzylowego poddawano katalitycznemu uwodornianiu dla wydzielenia grupy benzylowej.

Jako środek kondensujący stosowane dicykloheksylokarbodiimid w obecności 1-hydroksybenzotriazolu i N-etylomorfoliny w tetrahydrofuranie. Otrzymano 1,5 g estru benzylowego N-5-karboetoksy-pentametylenylo-L-proliło-D,L- β -metylo- β -alanylo-L-proliny w postaci syropu o wartości m/e przy 530 wynoszącym M+1. Po hydrolizie wodorotlenkiem baru z 0,5 g estru otrzymano 0,2 g żądanej N-5-karboetoksy-pentametylenylo(L-proliło-D,L- β -metylo- β -alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 80—84°; $[\alpha]^{25}_D = (C, 1, 1:1 \text{ metanol/woda}) - 90,1^\circ$.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{20}H_{27}N_3O_6 \cdot 1,25 H_2O$: 55,35 C; 8,38 H; 9,68 N.

Znaleziono: 55,49 C; 8,78 H; 9,05 N.

Przykład VI. Postępując w sposób analogiczny do opisanego powyżej 12,5 g (0,76 m) kwasu D,L-3-amino-3-fenylpropionowego poddaje się reakcji z 9,6 g (0,095 m) trietyloaminy i 20,7 g (0,095 m) di-tert-butylodiwęglanu w 250 ml dimetyloformamidu w temperaturze 25° w czasie 17 godzin. Otrzymuje się 19,9 g (79%) pochodnej w postaci stałej barwy białej o temperaturze topnienia 115—117°. Otrzymane 7,95 g (0,03 m) substancji poddaje się kondensacji z 7,23 g (0,05 m) chlorowodoru estru benzylowego L-proliny z uzyskaniem 13,6 g dipeptydu. Grupę ochronną wydziela się przez poddanie działaniu kwasu trifluorooctowego w dichloru metylenu i 1,3-dimetyloksybenzenie.

Po działaniu bezwodnym chlorowodorem otrzymuje się chlorowodórek estru benzylowego D,L- β -fenylo- β -alanylo-L-proliny w postaci stałej bar-

wy białej. Uzyskaną substancję w ilości 10,1 g (0,026 m) kondensuje się z 5,81 g (0,026 m) chlorowodoru L-N-karbometoksymetyloproliny, a po chromatografowaniu na żelu krzemionkowym z użyciem metanolu w chlorku metylenu, otrzymuje się 1,8 g estru benzyloвого N-karbometoksymetylo-L-prolilo-D,L-β-fenilo-β-alanylo-L-proliny. Po hydrolizie tego dwuестru wodorotlenkiem baru i następnym zakwaszeniu rozcieńczonym kwasem siarkowym otrzymuje się 0,99 g siarczanu N-karboksymetylo-L-prolilo-D,L-β-fenilo-β-alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 266–260°, $[\alpha]_{25}^D = C, 1, 1:1$ -metanol/woda) –43,2°.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{21}H_{27}N_3O_6 \cdot 0,25 H_2SO_4$ HO: 54,83 C; 6,46 H; 9,13 N.

Znaleziono: 54,86 C; 6,43 H; 8,24 N.

Przykład VII. Postępując w sposób analogiczny do opisanego powyżej 12,5 g (0,12 m) D,L-β-metylo-β-alaniny (kwasu D,I-3-aminomasłowego) poddaje się reakcji z 12,12 g (0,15 m) trietyloaminy i 32,7 g (0,15 m) di-tert-butylowęglanu w 300 ml dimetyloformamidu, uzyskując 18,5 g (76%) substancji stałej barwy białej o temperaturze topnienia 90–92°. Substancję tę w ilości 4,06 g (0,02 m) poddaje się reakcji kondensacji z 4,82 g (0,02 m) chlorowodoru estru benzyloвого proliny, z zastosowaniem dicykloheksylokarbodiimidu, prowadząc reakcję w temperaturze 25° w czasie 17 godzin. Po działaniu kwasem trifluorooctowym i bezwodnym chlorowodorem, otrzymuje się chlorowoderek estru benzyloвого D,L-β-metylo-β-alanylo-L-proliny, który w ilości 3,5 g (0,1 m) poddaje się reakcji kondensacji z 1,12 g (0,005 m) chlorowodoru N-karbometoksymetyloproliny w sposób opisany powyżej.

Otrzymany ester benzylovery N-karbometoksymetylo-L-prolilo-D,L-β-metylo-β-alanylo-L-proliny po hydrolizie wodorotlenkiem baru, a następnie po działaniu solą kwasu siarkowego daje półsiarczan N-karboksymetylo-L-prolilo-D,L-β-metylo-β-alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 135°, $[\alpha]_{25}^D = 63,3^\circ$ (C, 1, 50% wodny roztwór metanolu).

Mieszaninę diastereoizomerów (S, S, S i S, R, S) rozdziela się przez zastosowanie mieszaniny 9:1 woda–metanol dla C-18 kolumny wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z użyciem wody–metanolu–kwasu trifluorooctowego w stosunku 90:10:0,1 jako eluentu.

Zasadnicza linia rozdzielu ($\alpha = 1,29$) pozwala na rozdział S,S,S i S,R,S-izomerów o skręcalności optycznej odpowiednio $[\alpha]_{25}^D = -59,9^\circ$ (C, 1, 1:1 $CH_3OH \cdot H_2O$) oraz $[\alpha]_{25}^D = -44,8^\circ$ (C, 1, 1:1 $CH_3OH \cdot H_2O$).

Zastąpienie w tym procesie chlorowodoru N-(2-karboetoksy)-etylo-L-proliny jego niższym homologiem powoduje wytworzenie N-(2-karboksy)etylo-L-prolilo-D,L-β-metylo-β-alanylo-L-proliny.

Zastąpienie, w sposobie opisanym w przykładzie IV chlorowodorkiem N-(3-karbometoksy)propylo-D,L-proliny chlorowodorkiem N-(2-karboetoksy)etylo-L-proliny wytwarza się N-karboksypropylo-D,L-prolilo-L-alanylo-L-proliny w postaci zasady.

Przykład VIII. Mieszaninę 10,0 g (0,0529 m) N-tert-butoksykarbonylo-D-alaniny, 12,75 g (0,0529

m) chlorowodoru estru benzyloвого L-proliny, 14,29 g (0,0106 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 15 ml N-metylomorfoliny oraz 125 ml suchego tetrahydrofuranu poddaje się reakcji z 10,9 g (0,0529 m) dicykloheksylokarbodiimidu oraz 15 ml suchego tetrahydrofuranu i postępuje w sposób opisany powyżej. Otrzymuje się 20,4 g surowego estru benzyloвого N-tert-butoksykarbonylo-D-alanylo-L-proliny.

Po wydzieleniu grup ochronnych otrzymuje się chlorowoderek estru benzyloвого D-alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 140–142°C. Substancję tą w ilości 8,3 g (0,0265 m) poddaje się reakcji kondensacji z 5,92 g (0,0265 m) chlorowodoru N-karbometoksymetylo L-proliny z wytworzeniem 3,1 g estru benzyloвого N-karbometoksyetylo-L-prolilo-D-alanylo-L-proliny w postaci syropu.

Po działaniu wodorotlenkiem baru z 3,0 g (6,7 mm otrzymanego diestru uzyskuje się 2,1 g N-karboksymetylo-L-prolilo-D-alanylo-L-proliny o temperaturze topnienia 145–148°, $[\alpha]_{25}^D = 39,5^\circ$ (C, 1, 1:1 $CH_3OH \cdot H_2O$).

W sposób analogiczny wytwarza się N-2-karboksyetylo-L-prolilo-D-alanylo-L-prolinę o temperaturze topnienia 170° z rozkładem (temperatura mięknięcia 142–145°) $[\alpha]_{25}^D = 67,9^\circ$ (C, 1, 1:1 $CH_3OH \cdot H_2O$).

Przykład IX. Mieszaninę 6,28 g (0,0332 m) N-tert-butoksykarbonylo-β-alaniny, 5,0 g (0,0332 m) chlorowodoru L-prolino-amidu, 8,96 g (0,0664 m) 1-hydroksybenzotriazolu, 12 ml N-metylomorfoliny, 75 ml tetrahydrofuranu, 40 ml dimetyloformamidu i 6,84 g (0,0332 m) dicykloheksylokarbodiimidu miesza się w temperaturze 25° w czasie 17 godzin. Rozpuszczalniki odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i wodzie.

Rozdzieloną fazę organiczną przemycza się małą objętością rozcieńczonego kwasu solnego, solanką, 5% wodorowęglanem oraz solanką. Osuszony ekstrakt zateża się. Otrzymuje się 3,2 g N-tert-butoksykarbonylo-β-alanylo-L-prolinoamidu w postaci syropu. Widmo masowe metanowej jonizacji chemicznej jest zgodne z budową dipeptydu.

Produkt rozpuszcza się w 35 ml suchego chlorku metylenu, chłodzi w wodzie lodowej i dodaje 15 ml kwasu trifluorooctowego. Roztwór miesza się w temperaturze 0° w czasie 15 minut i w czasie 3 godzin w temperaturze 25°. Rozpuszczalniki odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°. Otrzymuje się sól trifluorooctową β-alanylo-L-prolinoamidu w postaci syropu. Związek ten (0,01 m) poddaje się kondensacji z chlorowodorkiem N-karbometoksymetylo-L-proliny, jak opisano powyżej z wytworzeniem N-karbometoksymetylo-L-prolilo-β-alanylo-L-prolinoamidu, z którego po działaniu wodorotlenkiem baru, otrzymuje się N-karboksymetylo-L-prolilo-β-alanylo-L-prolinoamid.

Przykład X. Zastępując estrem N-karbometoksymetylo-L-dehydroproliny wytworzonym metodą alkilowania Adams'a ester N-karbometoksymetylo-L-proliny w przykładzie I, wytwarza się N-karboksymetylo-L-dehydroprolilo-L-alanylo-L-

-prolinę w postaci siarczanu. Stosując w przykładzie I ester benzylový kwasu N-karbometoksymetylopiroglutaminowy wytworzony sposobem alkilowania Adams'a, otrzymuje się N-karboksymetylopiroglutamyl-L-alanylo-L-prolinę. Stosując w przykładzie I ester benzylový kwasu 2-pirolidynylooctowy zamiast estru benzylový L-proliny, otrzymuje się kwas N-karboksymetylo-L-prolilo-L-alanylo-2-pirolidynylooctowy. Stosując pochodną β -(2-tienylo)alaniny (The Chemistry of Heterocyclic Compound część III, Hartough, strona 262) zamiast pochodnej alaniny według przykładu I wytwarza się N-karboksymetylo-L-prolilo-D,L- β -(2-tienylo)-alanylo-L-prolinę.

Stosując w przykładzie I ester benzylový N-metylosulfometyloproliny, wytworzony według reakcji alkilowania Adams'a ze znanego estru metylový kwasu chlorometanosulfonowý, otrzymuje się N-sulfometylo-L-prolilo-L-alanylo-L-prolinę. Stosując w przykładzie I w miejscu estru benzylový N-dimetylofosfonometyloproliny znany ester dimetylový kwasu chlorometylofosfonomowý w alkilowaniu Adams'a, wytwarza się N-fosfonometylo-L-prolilo-L-alanylo-L-prolinę.

Zastrzeżenia patentowe

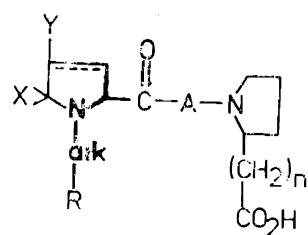
1. Sposób wytwarzania nowych tripeptydów o wzorze 1, w którym R oznacza grupę karboksylową, sulfonową lub fosfonową, alk oznacza grupę alkilenową o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym, zawierającą 1—5 atomów węgla za wyjątkiem grupy etylenowej, X oznacza atom O lub atomy H, Y oznacza atom H lub jeżeli X oznacza atomy H, H wówczas Y oznacza grupę OH, linia prze-

rywana oznacza ewentualne wiązanie węgiel—węgiel w przypadku gdy X oznacza atomy H, H a Y oznacza atom H, n oznacza liczbę 0—3 włącznie, a A oznacza resztę aminokwasu pochodzącą z D- lub L-Ala, D- lub L-Phe, D- lub L- β -metylo β -Ala, D- lub L-fenyl-Gly, D- lub L- β -fenyl- β -Ala, D- lub L- β -tienyl-Gly, D- lub L- β -Ala, kwasu γ -aminomasłowego, kwasu D- lub L-2-amino-masłowego, D- lub L-nor-Val, D- lub L-Leu, kwasu 3-amino-3-metylomasłowego, 2-metylo-Ala albo N-metylową pochodną wymienionych reszt, albo ich farmakologicznie dopuszczalnych soli niższych estrów alkilowych, o 1—5 atomach węgla w grupie alkilowej lub estru benzylový, **znamienny tym**, że związek o wzorze 2, w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie, a R¹ oznacza ochronioną grupę karboksylową, sulfonową lub fosfonową, poddaje się reakcji ze związkiem o wzorze 3, w którym A ma wyżej podane znaczenie, R² oznacza grupę ochronną funkcji karboksylowej, a R³ oznacza grupę anionową lub N-metyloaminową, wydziela każdą z grup ochronnych i ewentualnie przeprowadza w farmakologicznie dopuszczalne sole tripeptydu lub ich estry.

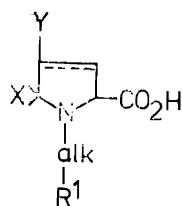
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w obecności karbodiimidu.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w obecności dicykloheksylokarbodiimidu.

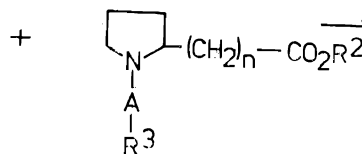
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że β -alanylo-L-pirolinę w postaci chlorowodoru estru benzylový, poddaje się reakcji z chlorowodorkiem N-karbometoksymetylo-L-proliny z wytworzeniem N-karboksymetylo-L-prolilo- β -alanylo-L-proliny.



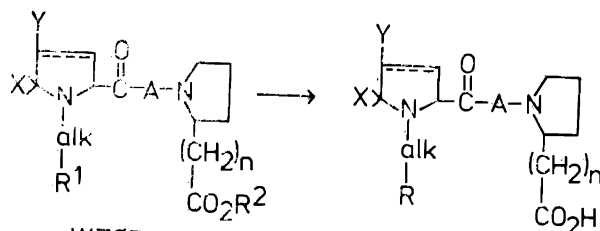
WZOR 1



WZOR 2



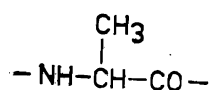
WZOR 3



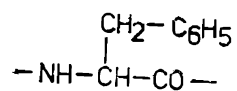
WZOR 4

WZOR 1

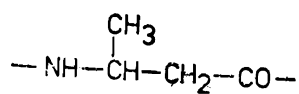
SCHEMAT



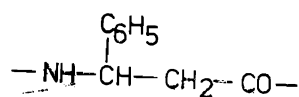
WZÓR 5



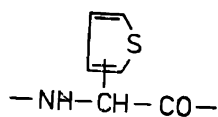
WZÓR 6



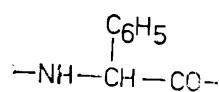
WZÓR 7



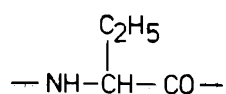
WZÓR 8



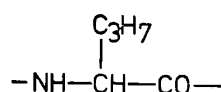
WZÓR 9



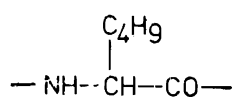
WZÓR 10



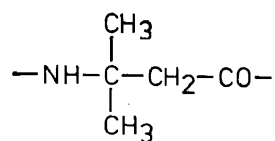
WZÓR 11



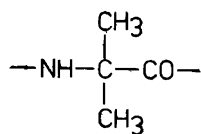
WZÓR 12



WZÓR 13



WZÓR 14



WZÓR 15



WZÓR 16