



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Регистров № 100961 (22) Заявено на 06.11.96 (24) Начало на действие на патента от: 26.04.95</p> <p style="text-align: center;">Приоритетни данни</p> <p>(31) 4415997 (32) 06.05.94 (33) DE</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № на (45) Отпечатано на 30.04.98 (46) Публикувано в бюлетин № 1 на 30.01.98 (56) Информационни източници: WO93/23424</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(73) Патентоприитежател(и): BASF AKTIENGESELLSCHAFT LUDWIGSHAFEN (DE)</p> <p>(72) Изобретател(и): Wilhelm Amberg, Friedrichsdorf Harald Bernard, Bad Duerkheim Ernst Buschmann, Ludwigshafen (DE) Andreas Haupt, Westboro, MA (US) Lothar Janitschke, Kleinniedesheim Bernd Janssen Ulrich Karl, Ludwigshafen Andreas Kling, Mannheim Stefan Mueller, Speyer Bernd De Potzolli, Bad Duerkheim Kurt Ritter, Heidelberg Marco Thyges, Ludwigshafen Thomas Zierke, Boehl-Iggelheim (DE)</p> <p>(74) Представител по индустриална собственост: Правда Георгиева Бойкова, 1000 София, ул. "Хан Аспарух" 26</p> <p>(86) № и дата на PCT заявка: PCT/EP95/01577, 26.04.95 (87) № и дата на PCT публикация: WO95/30691, 16.11.95</p>
--	--

(54) НОВО ПЕПТИДНО АКТИВНО ВЕЩЕСТВО И МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО МУ

(57) Изобретението се отнася до съединение Me₂Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl, което проявява антинеопластична активност. То се получава от съединението с формула



в която Z и R¹ имат дадените в описанието значения.

5 претенции

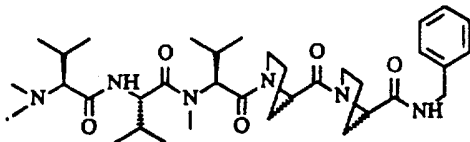
(54) НОВО ПЕПТИДНО АКТИВНО ВЕЩЕСТВО И МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО МУ

Област на техниката

Изобретението се отнася до ново пептидно активно вещество, до метод за получаването му, както и до подходящи изходни съединения за неговото получаване.

Предшествващо състояние на техниката

В РСТ заявка No WO 93/23424 са описани активни вещества на базата на пептиди, които имат интересна активност като антинеопластични средства. Особено добра активност проявява пентапептидът, описан в пример 234 на посочената заявка, който има следната формула:



$\text{Me}_2\text{Val-Val-MeVal-Pro-Pro-NHBzl}$

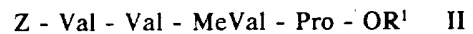
в която Me_2Val означава N,N-диметил-L-валин, MeVal означава N-метил-L-валин и Bzl означава бензилов остатък.

Съгласно цитираната РСТ-заявка този пептид се получава по метод в твърда фаза при използване на пролин като изходен продукт. При това продуктът се получава с нисък добив и в неочистена форма, поради което се налага скъпо хроматографско пречистване. Поради това методът, протичащ в твърда фаза, е подходящ само за получаване на малки количества от веществото. Досега не се е отдало получаването на веществото, описано в пример 234 на описание WO 93/23424 в кристална форма. Активното вещество се получава във вид на смола. Поради това отделянето на остатъците от разтворителите се осъществява трудно. Налага се използване на скъпо струващи етапи на пречистване (като сушене чрез пулверизиране или чрез замърсяване). Затруднява се също и следващата фармацевтична преработка на веществото. За изследване и въвеждане на веществото в терапията са необходими по-големи количества от него. За тяхното получаване е необходим промишлено осъществим метод, при който активното вещество се получава по възможност в кристална форма.

Техническа същност на изобретението

Сега е създаден метод, при който веществото се получава с голяма чистота без склонност към рацемизация, така че веществото може да се превърне без затруднения в кристална сол, а именно в хидрохлорид.

Същността на изобретението е метод за получаване на съединение с формула $\text{Me}_2\text{Val-Val-MeVal-Pro-Pro-NHBzl.HCl}$, който се състои в това, че от съединение с формула



в която R^1 означава C_{1-5} -алкилова група и Z е бензилоксикарбонилна защитна група, която може да бъде заместена във фениловия пръстен,

А а) се отцепва защитната група от N-края на пептида и полученото съединение се

20 подлага на:

двукратно метилиране на свободната аминокгрупа при N-края на пептида;

хидролиза на алкоксигрупата - OR^1 при C-края на пептида и

25 б) полученото съединение с формула

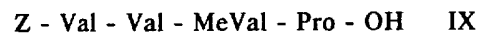


се присъединява към пролинбензиламид с формула XII

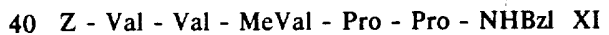
или

30 В а) се отстранява алкоксигрупа - OR^1 от C-края на пептида и

б) така полученото съединение с формула

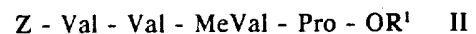


се присъединява към пролинбензиламид с формула XII и полученото съединение с формула

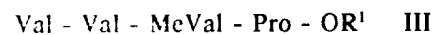


се освобождава от защитната Z група при N-края на пептида, свободната аминокгрупа при N-края на пептида се метилира двукратно и така полученото съединение се превръща в неговия хидрохлорид.

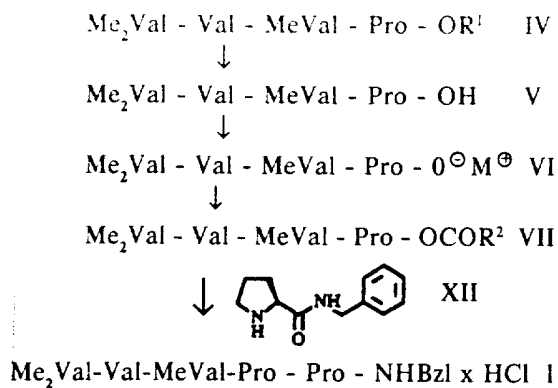
Метод А протича по следната реакционна схема:



↓



↓



Заместителите в горната схема, както и навсякъде в описанието имат следните значения:

R^1 : C_{1-5} -алкил, като метил, етил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, трет.бутил, изобутил, пентил и за предпочитане метил и етил;

R^2 : трет.бутил, 2-етилхексил, C_{1-4} -алкокси, като метокси, етокси, изобутокси,

Z: бензилоксикарбонил, заместен в даден случай във фениловия пръстен с халоген, C_{1-4} -алкил, C_{1-4} -алкокси, C_{1-4} -ацилокси или нитро, по-специално със заместители като 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 4-Br, 4- CH_3O -, 4- CH_3COO -, 2- NO_2 и 4- NO_2 ,

M^\oplus означава калиев, натриев, литиев или амониев йон, като $\oplus\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$;

Bzl означава бензил, Me означава метил, Pro означава пролин и Val означава валин.

Тетрапептидният естер с формула II се разтваря в подходящ разтворител, напр. алкохол, като метанол, етанол, изопропанол, бутанол; етер, като тетраhydroфуран, диоксан, метил-трет.бутилетер (МТВЕ); естер, като етилов естер на оцетната киселина; или ледена оцетна киселина. След прибавяне на подходящ катализатор, като например паладий върху въглен или платина върху въглен се въвежда водород при температура от 0 до 50°C, за предпочитане при 10 до 30°C. Внимателното въвеждане на водород може да се проведе при нормално налягане или при повишено налягане до 10 bar. Реакцията може да бъде ускорена чрез изтегляне на част от отработения газов поток. След края на изтегляне на водорода се прибавят 2 до 5 еквивалента формалдехид под формата на воден разтвор, или може да бъде газообразен, или под формата на параформалдехид. Накрая освен това се въвежда водород при описаните по-горе условия. След това катализаторът се отстранява чрез филтриране.

Съединението с формула IV може да се пречисти като хидрохлорид, чрез кристализация из подходящ разтворител или смес от разтворители. За тази цел се оказва подходящо използването на смес от изопропанол/метил-трет.бутилетер. Следи от Z-тетрапептидният естер с формула II могат да бъдат отстранени от продукта с формула IV също и при използване на екстракционни методи за разделяне.

Осапунването на естерите с формула IV се провежда в подходящ разтворител, като например алкохол, като метанол, етанол, изопропанол, етер, като метил-трет.бутилетер, тетраhydroфуран, диоксан; въгледород, като толуен, ксилен; или хлориран въгледород, като 1,2-дихлоретан, метилхлорид, хлороформ, при прибавяне или в отсъствие на вода, с подходяща база, като натриев хидроксид, калиев хидроксид или литиев хидроксид. Разпадането на естера може да се осъществи също с киселини. В случай, когато R^1 е трет.бутил, за тази цел е особено подходяща $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ киселина, както и разтвор на HCl в диоксан.

Получената тетрапептидна киселина с формула V трябва да се свърже с пролинбензиламид с формула XII до получаване на пентапептида с формула I. При такива реакции на присъединяване лесно се стига до рацемизация. Затова, за едно подобно присъединяване с тетрапептидна киселина с формула V като реагент за провеждане на присъединяването G.Pettit et al. (J.Am.Chem. Soc. 113, 6692-3 (1991)) използват $(\text{OC}_2\text{H}_5)_2\text{POC}(\text{DEPC})$. DEPC не може да се купува в големи количества. Затова този метод изисква допълнителни етапи, свързани с използване на отровни фосфорни и цианидни реагенти. Отпадъците, съдържащи цианиди, причиняват допълнителни проблеми. По тези причини този метод е неподходящ за промишлено приложение. Един метод за пептидно присъединяване, който е особено прост за приложение в технически мащаб, е методът на смесените анхидриди вж. например J.Meienhofer в The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Band 1, Academic Press, Orlando, 1979, стр. 264-314. При него киселината с формула V се депротонира с подходяща база, например третичен амин, като триетиламин, N-метилморфолин, дициклохексил-етиламин, диизопропилетиламин до получаване на съединение с формула VI. Естерите с формула IV могат да се превърнат също с бази, като натриев хидроксид, калиев

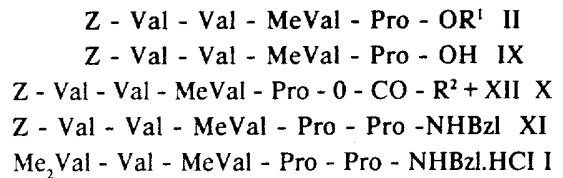
хидроксид или литиев хидроксид директно в солите с формула VI. Съединенията с формула VI се превръщат при взаимодействие с киселинен хлорид с формула ClCOR² в смесен анхидрид с формула VII. Освен пивалоилхлорид могат да се използват също и други киселинни хлориди, като например 2-етилхексан-киселинен хлорид, етилестер на хлормравчената киселина, метилестер на хлормравчената киселина и изобутилестер на хлормравчената киселина. Смесените анхидриди са склонни да предизвикат силна рацемизация /виж. напр. J.Meienhofer в The Peptides, Band 1, Academic Press, Orlando, 1979, стр. 276/.

Сега тетрапептидната киселина с формула V по изненадващ начин се обработва по метода на смесени анхидриди, без изобщо това да предизвиква рацемизация. Особено добри резултати се постигат със смесения анхидрид, който се получава от съединение с формула V и пивалоилхлорид. В противоречие с по-новите публикувани резултати /N.L.Benoiton et al., Can.J.Chem. 65, 619-625 (1987)/ превръщането с пивалоилхлорид води до по-добри резултати, що се отнася до селективност и добиви в сравнение с превръщането при използване на естери на хлормравчената киселина. Получаването на смесения анхидрид с формула VII и следващото присъединяване с пролинбензиламид се провежда при температури от -20 до +5°C, в подходящ разтворител, като диоксан, NMP, тетраhydroфуран, толуен, метилхлорид, диметилформамид. Вместо пролинбензиламид с формула XII може да се използва също и подходяща сол на това съединение, като напр. хидрогенсулфат, метилсулфонат, хидрохлорид или хидробромид.

При това тогава трябва да се добави още един еквивалент от база, например триетиламин. След провеждане на пептидното присъединяване и обичайната екстракционна обработка суровият продукт се разтваря в подходящ разтворител, например въглеродород, като толуен или ксилен,; или етер, като диетилетер, тетраhydroфуран, диоксан, метил-трет.бутилетер; кетон, като ацетон метилетилкетон, диетилкетон, циклохексанон; или в хлориран разтворител, като етиленхлорид, хлороформ, 1,2-дихлоретан. Чрез въвеждане на газообразен хлороводород или при добавяне на разтвор на хлороводород в подходящ разтворител, като тетраhydroфуран, метанол, изопропанол, п-

пентанол, диизопропилетер, се утаява хидрохлоридът с формула I. Особено подходящ се оказва при това метод, при който свободната база на пентапептида най-напред се разтваря в метилетилкетон и след това се добавя разтвор на HCl в изопропанол.

Метод В протича по следната схема:



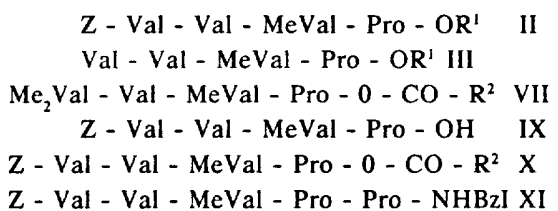
Осапунването на естера с формула II, получаването на смесени анхидриди с формула X и присъединяването на пептида към съединение с формула XI протича аналогично на последователността на синтезата IV → V → VI → VII → I. Отцепването на Z-защитната група и диметилирането до получаване на съединение с формула I протича по аналогия на превръщането в последователност II → III → IV.

Също така при вариант В на метода, използването на метода на смесен анхидрид протича по изненадващ начин без рацемизация на продукта. Противно на публикуваните от Benoiton резултати, при използване на смесен анхидрид, получен от киселината с формула IX и пивалоилхлорид, се получават най-високи добиви.

Необходимият за получаване на пептида с формула I изходен продукт с формула II може да се получи от Z-Val-O-CO-R² (XIII) и Val-MeVal-Pro-OR¹ (XIV).

По новия метод съгласно изобретението активното вещество с формула I се получава в кристална форма. Този пептид може по прост начин чрез прекристализация да се пречисти допълнително. Скъпите етапи на пречистване с помощта на хроматография не се налагат.

Изобретението се отнася също до следните междинни продукти за получаване на съединение с формула I:



в които R¹ и Z имат значенията, посочени в претенция 3 и R² е трет.бутил, 2-

етилхексил, C_{14} -алкокси, метокси, етокси и изобутокси.

Съединението с формула I проявява активност срещу твърди тумори (тумори на дробовите, на гърдата, на червата, на пикочния мехур, на дебелото черво, на матката, на простатата), както и срещу левкимия, лимфом и други неопластични заболявания.

Следващите примери илюстрират по-подробно изобретението.

Пример 1. (метод А).

А. Получаване на изходните съединения а. Z - Val - Val - MeVal - Pro - OMe (II, $R^1 = Me$)

В 400 l реактор за хидриране се зарежда 39.6 kg (83.3 mol) Z - Val - MeVal - Pro - OMe (VIII) в 320 l метанол, заедно с 4 kg 5% паладий върху въглен. След това се въвежда при охлаждане до температура от 20 до 30°C водород, толкова продължително, че в реакционния разтвор да не може да се докаже наличие на изходния продукт. Катализаторът се филтрира при източване на съдържанието на реактора. За обработване, реакционната смес се концентрира до обем 50 l в 400 l емайлиран реактор чрез вакуумиране с водоструйна помпа. След това се влива 50 l толуен и реакционната смес се екстрахира с 40 l 2N солна киселина. Толуеновата фаза се екстрахира още веднъж с 40 l 1N солна киселина и след това се източва. Общата кисела водна фаза се въвежда отново в реактора, обработва се с 40 l метиленхлорид до разслояване и накрая, чрез добавяне на приток от 50% разтвор на натриева основа при интензивно разбъркване и охлаждане, рН на реакционната смес се довежда до 9. След разделяне на слоевете метиленхлоридната фаза се източва и водната фаза се екстрахира още два пъти с по 40 l метиленхлорид. Обединеният метиленхлориден разтвор на продукт се промива с вода до неутрална реакция. Накрая метиленхлоридната фаза се концентрира до 90 l. Получава се Val - MeVal - Pro - OMe (XIV, $R^1 = CH_3$).

Добивът е 24.2 kg и представлява 85.2%.

В реактор от 400 l се разтваря 17.84 kg (70.88 mol) Z-валин и 4.59 kg (74.42 mol) триетиламин в 170 l метиленхлорид. Към този разтвор се прибавя на дози 8.58 kg (70.88 mol) хлорид на пивалиновата киселина (пивалоилхлорид) при температура от -5 до -10°C. След реакционно време от 2 h при -5°C започва при-

бавянето на разтвор на 24.2 kg от съединението Val-MeVal-Pro-OMe в 86 l метиленхлорид при -5°C. След престой на реакционната смес в продължение на още 2 h при -5°C, тя се загарява до 20°C и при тази температура се бърка в продължение на 12 h. След това реакционната смес се разработва чрез прибавяне на 50 l вода и след отделяне на водната фаза органичната фаза се екстрахира един път с 40 l 2N солна киселина и двукратно с по 40 l 2N натриева основа. След промиване на органичната фаза до неутрална реакция с вода, разтворителят метиленхлорид се отдестилира и се заменя с 300 l диизопропилетер. Емулсията на маслообразния продукт се загарява до 60°C, за предизвикване на кристализация се прибавят кристални зародиши и сместа се държи в продължение на 7 h при 60°C. За довършване на кристализацията сместа след това се бърка при 50°C в продължение на 5 h, след това още 5 h при 40°C и накрая се охлажда до 20°C. Кристалната суспензия се филтрира през 120 l филтър под налягане и кристалите се сушат в поток от азот.

Добивът е 32.2 kg и представлява 79%.
Т.т. 134-135°C.

б/ Пролинбензиламид-хидрохлорид (XII x HCl)

Към разтвор на 99.7 g Z-пролин и 58 ml триетиламин в 1 l метиленхлорид се прикапва при температура -10 до -15°C 48.2 g хлорид на пивалиновата киселина. Реакционната смес се бърка 45 min при -10°C и след това се прибавя при -10°C в продължение 1,5 h разтвор на 42.8 g бензиламин в 500 ml метиленхлорид. След това сместа се бърка в продължение на 1 h при стайна температура. Метиленхлоридният разтвор се промива двукратно с 500 l вода, два пъти с 500 ml 10%-ен воден разтвор на натриев бикарбонат, двукратно с 500 l вода, два пъти с 500 l 5% воден разтвор на лимонена киселина и накрая се промива два пъти с 500 l вода, суши се над натриев сулфат и се подлага на изпаряване. Остават 120 g остатък, който се разтваря в 200 ml етилацетат. Към етилацетатният разтвор се добавя 1.2 l n-хептан, разбърква се в продължение на 1 h, разтворителите се отделят чрез изсмукване на нучфилтър и остатъкът се суши при 50°C във вакуум.

Добивът е 110 g и представлява 81.3%.
Фр: 93-94°C.

110 g от така получения Z-пролинбензиламид се разтварят в 1.5 l метанол. След прибавяне на 0.5 g Pd/C(10%) се въвежда водород. Разтворът поема при стайна температура в продължение на час и половина 0.5 l водород. След отделяне на катализатора чрез филтриране и изпаряване се получава 4.6 g остатък във вид на жълто масло.

413 g от така получения пролинбензиламид се разтваря в 400 ml изопропанол. Прибавя се 630 ml от наситен разтвор на HCl в изопропанол, получената суспензия се бърка 2 h при температура от 0 до 5°C, разтворителят се изсмуква на нуч-филтър и остатъкът се промива двукратно с 250 ml изопропанол. Остатъкът се суши при 50°C във вакуум. Получава се 401 g пролинбензиламид - хидрохлорид α_D^{20} : - 45°.

В. Получаване на крайния продукт

а.1 Me₂Val - Val - MeVal - Pro - OMe x HCl (IV x HCl, R¹ = Me)

В 400 l реактор за хидриране се зареждат 20 kg (34.8 mol) Z - Val - Val - MeVal - Pro - OMe (II, R¹ = Me), заедно с 2 kg 5% паладий върху въглен в 200 l метанол. След това се въвежда при охлаждане до 20°C водород толкова дълго, докато в реакционния разтвор не се доказва наличие на изходния продукт. Накрая се добавя 8.46 kg 37% (104 mol) воден разтвор на формалдехид и хидрирането продължава при 20°C, докато спре поемането на водород от сместа. Катализаторът се отделя чрез филтриране при изпразване на реактора. За разработване на реакционната смес, тя се концентрира в 400 l емайлиран реактор до 50 l чрез вакуумиране с водоструйна помпа. След това се добавя 200 l изопропанол и разтворът отново се концентрира до 50 l. Накрая този концентрат се разтваря в 135 l метил-трет.бутилтер и се прибавя при охлаждане при 20°C един еквивалент изопропанолов разтвор на HCl. Получената суспензия се бърка още 3-4 h при 20°C и 2 h при 0 до 5°C, след което се филтрира през 120-l филтър под налягане. Филтърният остатък се промива един път с 50 l свеж метил-трет.бутилтер.

Добивът е 16.2 kg и представлява 92.3%. Т.т. 224°C (с разлагане).

а.2 Изолирането на продукта от междинния етап Val-Val-MeVal-Pro-OMe (III, R¹ = CH³) може също да стане възможно, ако след първия етап на хидриране сместа се обработи по следния начин.

Реакционният разтвор се отделя от катализатора и се подлага на изпаряване. Остатъкът се разтваря в етилацетат и този разтвор се екстрахира двукратно с 2N солна киселина. Киселата водна фаза се алкализира с разтвор на натриева основа до рН 9 и се екстрахира двукратно с метиленхлорид. Метиленхлоридната фаза накрая се промива до неутрална реакция и се изпарява.

Високоэффективна течна хроматография: 96.8%

¹H ЯМР (400 MHz, CDCl₃/TMS_{int}):

δ(ppm): 0.84 - 1.08 (m, 18H); 1.45 - 1.6 (S, широк, NH₂);

1.85 - 2.15 (m, 4H); 2.18 - 2.38 (m, 3H);

3.15 (s, N-CH₃); 3.25 (d, 1H); 3.65 - 3.75 (m, 1H);

3.73 (s, O-CH₃); 3.9 - 4.05 (m, 1H); 4.38 - 4.45 (m, 1H);

4.73 - 4.83 (m, 1H); 5.12 (d, 1H); 7.9 (d, NH).

а.3. Получаването на Me₂Val - Val - MeVal - Pro - OMe x HCl (IV x HCl, R¹ = Me) може да се проведе също чрез използване на следващата последователност от етапи, при което се избягват етапите на изолиране и пречистване на междинното съединение

Z - Val - Val - MeVal - Pro - OMe (II, R¹ = Me):

В 4 l колба се разтварят 128 g (0.51 mol) Z - валин и 55.1 g (0.54 mol) триетиламин в 1.2 l метиленхлорид. Към този разтвор на дози се прибавя 62.1 g (0.51 mol) хлорид на пивалиновата киселина при температура от -5°C до -10°C. След протичане на реакцията в продължение на 2 h при -5°C се прибавя разтвор на 174.6 g (0.51 mol) Val - MeVal - Pro - OMe в 0.8 l метиленхлорид, след което реакционната смес се бърка още 2 h при -5°C и след загряване до 20°C разбъркването продължава още 12 h. След това се прибавят 370 ml вода и получените слоеве се разделят. Метиленхлоридната фаза се промива последователно един път с 290 ml 2N солна киселина, два пъти с по 290 ml 2N натриева основа и три пъти с 370 ml вода. Накрая разтворителят метиленхлорид се изпарява и се заменя с 3 l метанол. Към този разтвор се прибавя утайка от 30 g 5% паладий върху въглен в 110 ml вода и се подлага на хидриране при 25°C в клатачна машина и бюрета за подаване на водород, до поглъщане на един еквивалент водород. След това се добавя 123 g (1.53 mol)

37% воден разтвор на формалдехид и хидрирането продължава, до поемане на още 2 eqv. водород. Катализаторът се отстранява от реакционната смес и тя се подлага на изпаряване в ротационен изпарител. Получава се остатък във вид на масло, което се разтваря в 670 ml изопропанол и 2.6 l метил-трет-бутилтер. Към този разтвор се прибавя еквивалентно количество от HCl в изопропанол. Получената суспензия се бърка при 20°C в продължение на повече от 12 h и след това се подлага на изсмукване на нуч-филтър. Утайката върху филтъра се промива с малко метил-трет-бутилтер и се суши във вакуумсушилня при 40°C.

Добивът е 182.8 g и представлява 71 %.
Т.т. 224°C (с разлагане).

b/ Me₂Val, - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl (I)

В 400 l реактор се зареждат 15.9 kg (31.5 mol)

Me₂Val - Val - MeVal - Pro - OMe x HCl (IV x HCl, R¹ = Me), заедно със 140 l толуен и 15 l метанол. След това се прибавя 3.15 kg (76.38 mol) натриева основа на зърна. След пълно протичане на осапунването, т.е след 3 h при 20°C, реакционната смес се неутрализира чрез добавяне на разтвор на HCl в изопропанол. След това се провежда азеотропна дестилация с толуен при 100 mbar до пълно освобождение от алкохола и водата. Отдестилиращият се разтворител се заменя постепенно с толуен. След това се добавят 80 l метилхлорид и 6.44 kg (63.0 mol) триетиламин (съдържание: 99%), сместа се охлажда до -5°C и при тази температура се прибавя на дози 3.84 kg (31.5 mol) хлорид на пивалиновата киселина. Реакцията продължава 2 h, след което се прибавя на порции 7.6 kg (31.5 mol) Pro-NHBzl x HCl при температура от -5°C до 0°C и сместа се оставя да престои 2 h при -5°C. След това температурата се повишава чрез загряване до 20°C и сместа се оставя да реагира в продължение на още 6 h. Накрая метилхлоридът се дестилира при 500 mbar и се добавя 80 l толуен. След това се добавя 50 l водата и рН-стойността на водната фаза се нагласява на 9. Сместа се бърка енергично и тогава водната фаза се отстранява, а органичната фаза се промива еднократно с 25 l вода. След това органичната фаза се екстрахира двукратно с по 50 l 2N солна киселина. Продуктът се ек-

трахира от киселата водна фаза след коригиране на рН-стойността на 9 чрез трикратна екстракция с по 50 l метилхлорид. След неутрализиране на метилхлоридната фаза с вода метилхлоридът се отстранява чрез дестилация и се заменя със 180 l метилетилкетон. Разтворът се загрява до 40°C и се смесва с един еквивалент (31.5 mol) разтвор на HCl в изопропанол. Получената суспензия се загрява до 60°C и без да се загрява повече се бърка в продължение на 12 h. След това реакционната смес се охлажда до 20°C и се бърка още 5 h, охлажда се до 5°C и се филтрира през 120 l филтър под налягане. Утайката върху филтъра се промива с 60 l пресен, охладен до 5°C метилетилкетон. След предварително сушене върху филтъра продуктът се суши във вакуумсушилня при 40°C до постоянно тегло.

Добивът е 14.36 kg и представлява 67%.
Т.т. 214°C (с разлагане).

Пример 2. (метод B).

a. Z - Val - Val - MeVal - Pro - OH (IX)

В двулитрова колба се разтваря 117 g (0.2 mol)

Z - Val - Val - MeVal - Pro - OMe (II, R¹ = Me, пример 1Aa) в 900 ml метанол и 47.5 ml вода. Прибавя се 18 g (0.45 mol) вода. Прибавя се 18 g (0.45 mol) натриева основа на зърна и разтворът се бърка в продължение на 12 h при 20°C. Към реакционната смес се прибавя 250 ml вода и метанолът се дестилира. След това се прибавя етилацетът до тогава, докато се постигне ясно разграничаване на фазите (около 500 ml). Етилацетатната фаза се отделя. Водната фаза се подкислява със солна киселина до рН 1 и се екстрахира двукратно с метилхлорид. Органичната фаза след това се изпарява до сухо.

Добивът е 105 g и представлява 96.4%.

¹H ЯМР (200 MHz, CDCl₃/TMS_{int}):

δ(ppm): 0.6 - 1.2 (m, 18H); 1.7 - 2.45 (m, 7H); 3.2 (s, N-CH₃);

3.55 - 3.95 (m, 2H); 4.05 - 4.2 (m, 1H); 4.35 - 4.5 (m,

1H): 4.68 - 4.85 (m, 1H); 4.98 - 5.2 (m, 3H); 5.93 (d, Val-

1NH); 7.2 - 7.4 (m, 5H); 7.53 - 7.68 (Val-2NH); 9.6 - 10.2

(s, широк, COOH).

b. Z - Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl (XI)

5 g от съединението Z - Val - Val - MeVal

- Pro - OH (8.75 mmol) (IX) се разтварят в 50 ml метиленхлорид, на капки се прибавя 1.79 g (17.5 mmol) триетиламин, сместа се охлажда до 10°C и при тази температура се прибавя на капки 1.08 g (8.75 mmol) хлорид на пивалиновата киселина. След разбъркване в продължение на 2 h при 10°C при тази температура се прибавя на капки разтвор на 2.11 g (8.75 mmol) Pro-NHBzl x HCl в 10 ml метанол. Разбъркването продължава още 2 h при 10°C и след това в продължение на една нощ при стайна температура.

Реакционната смес се промива трикратно с по 50 ml вода, един път с 50 ml вода при pH 9 и след това още два пъти с по 50 ml вода. Метиленхлоридният разтвор се центрофугира. Като остатък се получава 5.3 g (81.4%) от бял кристален продукт (чистота 88.7%).

Т.т. 118-122°C.

c. Me₂Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl (I)

12 g от съединението Z - Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl (XI) се разтварят в 200 ml метанол. Прибавя се 2 g 5% палатий върху вършен (разбъркан с 20 ml вода) и реакционната смес се хидрира при 20°C, докато престане поглъщането на водород. След това се прибавя 6.5 g 37% воден разтвор на формалдехид и хидрирането се продължава, докато престане поглъщането на водород. Катализаторът се отстранява и реакционният разтвор се подлага на изпаряване. Остатъкът се разтваря в толуен, отново се подлага на изпаряване, отново се прибавя 200 ml толуен и се филтрира. След това толуеновият разтвор се екстрахира двукратно с по 50 ml 2 N солна киселина. Киселата водна фаза се алкализира с натриева основа до pH 9 и се екстрахира трикратно с 50 ml метиленхлорид. Метиленхлоридната фаза се промива с вода до неутрална реакция и се изпарява. Суровата база се разтваря в смес от 150 ml метилетилкетон и 7.5 ml изопропанол. От този разтвор след прибавяне на 4 g 25% разтвор на HCl в изопропанол при 40°C изпада продуктът във вид на хидрохлоридна сол. Суспензията се бърка 3 h при 20°C и 1 h при 0 до 5°C след това се филтрира на нуч-филтър.

Добивът е 7.1 g.

Съдържание: 99.1% (високоефективна течна хроматография, като % на площта).

Т.т. 214°C (с разлагане).

Патентни претенции

1. Пептид с формула Me₂Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl (I).

2. Пептид с формула Me₂Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl (I) в кристална форма.

3. Метод за получаване на съединение с формула Me₂Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl.HCl, характеризиращ се с това, че от съединение с формула II



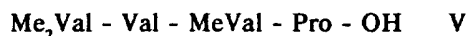
в която R¹ означава C₁₋₃алкилова група и Z е бензилоксикарбонилна защитна група, която може да бъде заместена във фениловия пръстен,

A a) се отцепва защитната Z група от N-края на пептида и полученото съединение се подлага на:

двукратно метилиране на свободната аминогрупа при N-края на пептида;

хидролиза на алкоксигрупата - OR¹ при C-края на пептида и

b) така полученото съединение с формула



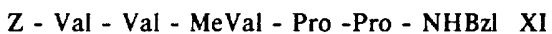
се присъединява към пролинбензиламид, или

V a) се отстранява алкоксигрупата - OR¹ от C-края на пептида и

b) така полученото съединение с формула



се присъединява към пролинбензиламид и полученото съединение с формула



се освобождава от защитната Z група при N-края на пептида;

свободната аминогрупа при N-края на пептида се метилира двукратно и така полученото съединение се превръща в неговия хидрохлорид.

4. Метод съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че тетрапептидкарбоксилните киселини с формула V, съответно IX за целите на присъединяване към пролинбензиламида първоначално се превръщат в смеси анхидриди с пивалинова киселина.

5. Междинни продукти за получаване

на съединение с формула I съгласно претенция I с формули

Z - Val - Val - MeVal - Pro - OR ¹	II
Val - Val - MeVal - Pro - OR ¹	III
Me ₂ Val - Val - MeVal - Pro - O - CO - R ²	VII
Z - Val - Val - MeVal - Pro - OH	IX

Z - Val - Val - MeVal - Pro - O - CO - R² X
 Z - Val - Val - MeVal - Pro - Pro - NHBzl XI

където R¹ и Z имат значенията, посочени в претенция 3 и R² е трет.бутил, 2-стил-хексил, C₁₋₄-алкокси, метокси, етокси или изобутокси.

Издание на Патентното ведомство на Република България
 1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Р.Николова

Пор. № 38873

Тираж: 40 MB