

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

230542

(II) (BI)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 27 07 82  
(21) (PV 5670-82)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>

C 07 C 103/52

(40) Zveřejněno 30 12 83

(45) Vydáno 15 05 86

(75)  
Autor vynálezu

KROJIDLO MILAN prom. chem. CSc., FLEGEL MARTIN RNDr. CSc.,  
LÉBEL MICHAL ing. CSc., KOLÍNSKÝ JIŘÍ ing., PRAHA

## (54) Způsob přípravy cyklických peptidů

1

Vynález se týká způsobu přípravy cyklických peptidů.

Charakteristickým strukturním rysem neurohypofysárních hormonů a jejich analogů je jejich cyklická struktura, která má značný význam z hlediska biologické účinnosti látek. Proto bylo nutno věnovat uzavírání cyklu značnou pozornost a vypracovat vhodný způsob provádění cyklizační reakce na modelových peptidech. Takto získané výsledky mají potom dosti obecnou platnost.

V případě, že cyklizace probíhá za tvorby amidické vazby, je většinou připravován aktivní ester chráněného peptidu a bezprostředně před kondenzací je nutno chránicí skupinu odstranit (čs. patent č. 149 028, Sakakibara S., Hase S.: Bull. Chem. Soc. Japan **41**, 2816 (1968)).

Tento způsob nedovoluje použití velmi aktivních esterů, neboť by tyto nebyly zachovány za podmínek odštěpení chránicích skupin. Navíc příprava aktivního esteru s použitím substituovaných sulfitů (Iselin B., Schwyzer R.: Helv. Chim. Acta **43**, 1760 (1960)) je poměrně zdlouhavá a příprava vlastního činidla představuje další syntetický stupeň.

Použití vysoce aktivovaného esteru má na druhé straně výhodu v možnosti použití vyšší koncentrace při cyklizaci, neboť intramolekulární tvorba amidické vazby je prakticky okamžitá. Dále je možno snížit dobu pobytu peptidického materiálu v alkalickém prostředí při zvýšené teplotě, což je zvláště důležité u peptidů obsahujících aminokyselinové zbytky citlivé k racemizaci.

Uvedené problémy řeší způsob přípravy cyklických peptidů ze skupiny dipeptidů až oktapeptidů, cyklizací a vytvořením amidické vazby a s použitím aktivního esteru protonací chráněného peptidu podle vynálezu, při němž se odpovídající peptid s volnou karboxylovou skupinou a aminoskupinou chráněnou protonací převádí nejprve reakcí s 1-hydroxybenzotriazolem pomocí dicyklohexylkarbodiimidu v příslušný aktivní N-hydroxybenzotriazolylester, který se působením prostředí s hodnotou pH 8,0 až 10,0, s výhodou 8,6 až 9,0 podrobí cyklizaci.

Při uvedeném způsobu přípravy se jako prostředí s hodnotou pH 8,0 až 10,0 používá metanolického roztoku triethylaminu nebo N-etylpiperidinu.

Způsob provedení cyklizace se dále objasňuje v příkladech provedení.

#### P ř í k l a d 1

##### Deamino-1-karboxytcocin

K roztoku Z-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>COOH)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (2,25 g, chromatograficky čistý) v kyselině octové (20 ml) se přidá roztok 35% bromovodíku v kyselině octové (20 ml). Po vysrážení éterem a vysušení se získaný hydrobromid oktapeptidemidu rozpustí ve směsi dimethylformamidu (30 ml) a dioxanu (21 ml), roztok se ochladí na 0 °C, přidá se 1-hydroxybenzotriazol (2,98 g) a dicyklohexylkarbodiimid (3,24 g) a v míchání se pokračuje 2 h při teplotě místnosti.

Poté se suspenze zfiltruje a filtrát nakape do směsi metanolu (1 000 ml), pyridinu (50 ml) a triethylaminu (10 ml). Po 2 h stání při teplotě místnosti se reakční směs odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 50% kyselině octové a čistí průchodem přes molekulární síto na bázi dextrenového gelu.

K eluci se použije 50% kyselina octová. Lyofilizací eluátu se získá 1,4 g produktu, který se čistí kapalinovou chromatografií na koloně modifikovaného silikagelu C<sub>18</sub> (800 g) pomocí mobilní fáze obsahující 50 % obj. metanolu a 50 % obj. 0,2% kyseliny trifluoroctové. Odpařením a lyofilizací se získá 0,416 g (20 % teorie) deamino-1-karboxytcocinu. Čistota látky byla ověřena kapalinovou chromatografií (2 systémy) a chromatografií na tenké vrstvě (4 systémy).

Pro C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>S.4 H<sub>2</sub>O (1 046,2):

vypočteno: 50,52 % C, 7,23 % H, 14,73 % N;  
nalezeno: 50,58 % C, 6,94 % H, 14,68 % N.

Aminokyselinová analýza: Asp 1,00, Glu 0,97, Pro 0,99, Cys(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>COOH) 1,02, Gly 1,00, Ile 0,96, Leu 0,99, Tyr 0,98.

#### P ř í k l a d 2

##### (2-0-metylytyrosin)deamino-1-karboxytcocin

K roztoku Nps-Tyr(Me)-Ile-Gln-Asn-Cys(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>COOH)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (17,4 g, chromatograficky čistý) v dimethylformamidu (180 ml) se přidá roztok 2N chlorovodíku v eteru (50 ml). Po 15 minutách stání při teplotě místnosti se vysráží vzniklý hydrochlorid oktapeptidemidu éterem, vysuší a rozpustí ve směsi dimethylformamidu (240 ml) a dioxanu (150 ml). Po ochlazení na 0 °C se přidá 1-hydroxybenzotriazol (21 g) a dicyklohexylkarbodiimid (23,1 g) a reakční směs se míchá 2 h při teplotě místnosti. Poté se zfiltruje a filtrát se nakape do směsi metanolu (4 000 ml) a triethylaminu (35 ml) za míchání. Po 2 h stání při teplotě místnosti se reakční směs odpaří do sucha, odparek rozpustí

v 50% kyselině octové a čistí na koloně molekulárního síta (4 000 ml), s použitím 50% kyseliny octové jako elučního činidla. Lyofilizací eluátu se získá 9,3 g produktu, který se čistí kapalinovou chromatografií na koloně modifikovaného silikagelu ( $C_{18}$ ) (500 g) pomocí mobilní fáze obsahující 50 % obj. metanolu a 50 % obj. 0,2% kyseliny trifluoroctové. Odpařením a lyofilizací se získá 3,38 g (22 % teorie) (2-0-metyltirosin)deamino-1-karba-oxytocinu: ( $\alpha$ )<sup>25</sup> = -74,30° ( $c = 0,2$ ; 1M kyselina octová). Čistota látky byla ověřena kapalinovou chromatografií (2 systémy) a chromatografií na tenké vrstvě (4 systémy).

Pro  $C_{45}H_{69}N_{11}O_{12}S \cdot 2 H_2O$  (1 024,1):

vypočteno: 52,78 % C, 6,99 % H, 15,05 % N;  
nalezeno: 52,50 % C, 6,93 % H, 15,29 % N.

Aminokyselinová analýza: Asp 0,96, Glu 1,02, Pro 1,01, Gly 0,98, Cys ( $C_3H_6COOH$ ) 0,93, Ile 1,00, Leu 1,03, Tyr 0,98.

### P ř í k l a d 3

(2-p-metylfenylalanin)deamino-6-karbaoxytocin

a) K roztoku Np-Phe(Me)-Ile-Gln-Asn-HCy( $C_2H_4COOH$ )-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (200 mg) v dimethylformamidu (5 ml) se přidá roztok 3,6 N chlorovodíku v éteru (0,5 ml). Po 7 minutách stání při teplotě místnosti se vzniklý hydrochlorid oktapeptidamidu vysráží éterem, vysuší a rozpustí ve směsi dimethylformamidu (3 ml) a dioxanu (1,8 ml). Po ochlazení na 0 °C se přidá 1-hydroxybenzotriazol (241 mg) a dicyklohexylkerbodiimid (265 mg) a reakční směs se míchá 2 h při teplotě místnosti.

Zfiltruje se a filtrát se nakape do směsi metanolu (200 ml) a N-etylpyridinu, kterého se přidá tolik, aby pH směsi bylo přibližně 8,5 (asi 0,6 ml). Po 2 h zahřívání na 60 °C se reakční směs odpaří na malý objem, vysráží éterem a produkt se vysuší. Preparativní chromatografií na koloně modifikovaného silikagelu ( $C_{18}$ ) (50 x 0,9 cm) v systému 55 % obj. metanolu a 45 % vody se získá 31 mg (17 % teorie) (2-p-metylfenylalanin)deamino-6-karbaoxytocinu. Čistota látky byla ověřena analogicky jako v příkladu 1.

Pro  $C_{45}H_{69}N_{11}O_{11}S \cdot 4 H_2O$  (1 044):

vypočteno: 51,76 % C, 7,43 % H, 14,75 % N;  
nalezeno: 51,89 % C, 7,15 % H, 14,73 % N.

Aminokyselinová analýza: Asp 1,03, Glu 1,01, Pro 0,94, Gly 1,00, Ile 0,96, Leu 1,05, Phe(Me) 1,08 HCy( $C_2H_4COOH$ ) 0,90.

b) Cyklizace byla provedena jako v předchozím odstavci, až na to, že roztok aktivního esteru byl vnesen do 200 ml pyridinu. Stejným způsobem zpracování a čištění jako výše se získá 18 mg (10 % teorie) látky stejné jako postupem a).

## P ř í k l a d 4

## (2-fenylalanin)deamino-6-karboxytycin

Nps-Phe-Ile-Gln-Asn-HCy(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COOH)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (200 mg) se zpracuje způsobem popsaným v příkladu 3a). Čištěním preparativní chromatografií na koloně modifikovaného silikagelu (C<sub>18</sub>) (50 x 0,9 cm) v systému 50 % obj. metanolu a 50 % obj. vody se získá 29 mg (16 % teorie) žádaného produktu, jehož čistota a analytické hodnoty byly prokázány výše popsanými metodami.

Pro C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>S.2 H<sub>2</sub>O (994,2):

vypočteno: 53,15 % C, 7,20 % H, 15,50 % N;  
nalezeno: 52,90 % C, 6,95 % H, 15,26 % N.

Aminokyselinová analýza: Asp 0,96, Glu 1,01, Pro 1,02, Gly 0,97, Ile 0,97, Leu 1,06, Phe 1,01, HCy(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COOH) 1,01.

## P ř í k l a d 5

## Deamino-6-karboxytycin

Z Nps-Tyr-Ile-Gln-Asn-HCy(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COH)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (200 mg) se chránicí skupina odstraní způsobem popsaným v příkladu 3a). Hydrochlorid oktapeptidamidu se rozpustí v dimethylformamidu (4 ml), ochladí na 0 °C, přidá 1-hydroxybenztriazol (241 mg) a dicyklohexylkarbodiimid (265 mg). Po 2,5 h míchání při teplotě místnosti se suspenze zfiltruje do směsi metanolu (200 ml) a N-etylpyperidinu (0,45 ml; pH 8,5). Po 1 h zahřívání na 50 °C se roztok zpracuje stejně jako v příkladu 3a).

Čištěním preparativní chromatografií jako v příkladu 4, ale v systému 40 % obj. metanolu a 60 % obj. vody se získá 36 mg (20 % teorie) deamino-6-karboxytycinu, jehož čistota a identita byla ověřena výše popsanými metodami.

Pro C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>S.4 H<sub>2</sub>O (1 046):

vypočteno: 50,52 % C, 7,23 % H, 14,73 % N;  
nalezeno: 50,38 % C, 7,11 % H, 14,58 % N.

Aminokyselinová analýza: Asp 1,01, Glu 0,96, Pro 1,04, Gly 0,98, Ile 1,00, HCy(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COOH) 0,96, Leu 1,03, Tyr 0,97.

## P ř í k l a d 6

## Cyklo(fenylalaninyl-glycyl)

Glycyl-fenylalanin (0,53 g) se rozpustí ve 2,4 M chlorovodíku v metanolu (15 ml), ihned se odpaří, vysráží éterem a vysuší. Vzniklý hydrochlorid dipeptidu se rozpustí ve směsi dimethylformamidu (10 ml) a dioxenu (5 ml). Po ochlazení na 0 °C se přidá 1-hydroxybenztriazol (1,28 g) a dicyklohexylkarbodiimid (0,75 g) a reakční směs se míchá 2 h při teplotě místnosti. Suspenze se zfiltruje a filtrát nakepe do směsi metanolu (250 ml) a N-etylpyperidinu, kterého se přidá tolik, aby pH směsi bylo přibližně 8,5. Roztok se míchá 20 h při teplotě místnosti, poté se zahustí a vysráží éterem. Získaný produkt (0,37 g) se přečistí preparativní kapalinovou chromatografií výše popsaným způsobem. Získá se 159,1 mg (33 % teorie) produktu s t. t. 263 až 265 °C.

Pro  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  (204,3):

vypočteno: 64,61 % C, 5,87 % H, 13,71 % N;  
nalezeno: 64,30 % C, 5,98 % H, 13,42 % N.

P ř í k l e d 7

Cyklo( $N^E$ -tosyllsyl-glycyl)

Hydromid  $N^E$ -tosyllsyl-glycinu (438,3 mg) se cyklizuje způsobem popsáným v příkladu 6. Přečištěním preparativní kapalinovou chromatografií se získá 190 mg (56 % teorie) produktu s t. t. 184 až 185 °C.

Pro  $C_{15}H_{21}N_3O_4S$  (339,42):

vypočteno: 53,08 % C 6,24 % H, 12,37 % N;  
nalezeno: 52,95 % C, 6,34 % H, 12,19 % N.

#### P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy cyklických peptidů ze skupiny dipeptidů až oktapeptidů, cyklizací s vytvořením amidické vazby a s použitím aktivního esteru protonací chráněného peptidu, vyznačující se tím, že se odpovídající peptid s volnou karboxylovou skupinou a aminoskupinou chráněnou protonací převádí nejprve reakcí s 1-hydroxybenzotriazolem pomocí dicyklohexylkarbodiimidu v příslušný aktivní N-hydroxybenzotriazolylester, který se působením prostředí s hodnotou pH 8,0 až 10,0, s výhodou 8,6 až 9,0 podrobí cyklizaci.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako prostředí s hodnotou pH 8,0 až 10,0 používá metenolického roztoku triethylaminu nebo N-etylpiiperidinu.