



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

255896

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 5/00
C 07 C 101/00

(22) Přihlášeno 04 10 85
(21) PV 7141-85
(32) (31)(33) Právo přednosti od 05 10 84
(P 34 36 569.9) Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 11 06 87

(45) Vydáno 16 01 89

(72) Autor vynálezu

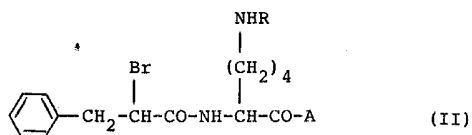
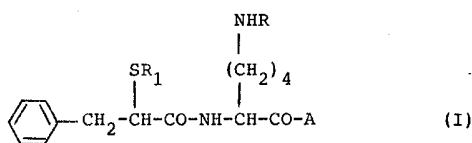
(73) Majitel patentu

ROOS OTTO dr., SCHWABENHEIM, SCHNORRENBURG GERD dr., INGELHEIM/R.,
LÖSEL WALTER dr., WIEDEMANN INGRID dr., GAU-ALGESHEIM, GAIDA WOLFRAM dr.,
INGELHEIM/R., HOEFKE WOLFGANG dr., WIESBADEN (NSR)

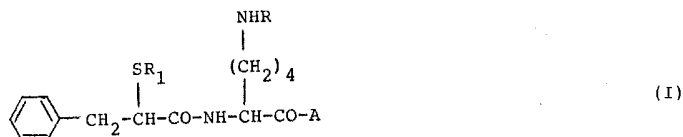
BOEHRINGER INGELHEIM KG, INGELHEIM/R. (NSR)

(54) Způsob výroby derivátů aminokyselin

Způsob výroby derivátů aminokyselin obecného vzorce I, ve kterém R_1 znamená vodík nebo acetyl, R znamená vodík, acetyl nebo terc.butoxykarbonyl a A představuje peptidickou vazbou přes atom dusíku navázaný zbytek popřípadě substituovaného či esterifikovaného prolinu nebo 4-karboxythiazolidinu, spočívající v reakci sloučeniny obecného vzorce II s merkaptosloučeninou obecného vzorce III a v případném následujícím převedení získané volné sloučeniny na sůl. Vyráběné sloučeniny silně inhibují enzym konvertující angiotensin I a lze je používat jako léčiva.



Vynález se týká nových derivátů aminokyslein obecného vzorce I



a jejich solí, přičemž předmětem vynálezu je způsob výroby těchto látek.

Dále vynález popisuje farmaceutické prostředky obsahující shora uvedené sloučeniny jako účinné látky a jejich použití léčiv.

Ve shora uvedeném obecném vzorci I

R_1 znamená atom vodíku nebo acetylovou skupinu,

R představuje atom vodíku, acetylovou skupinu nebo terc. butoxykarbonylovou skupinu a

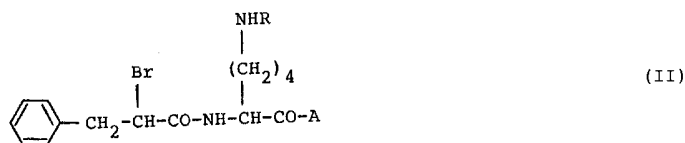
A znamená zbytek prolinu, 4-karboxythiazolidin-3-ylový zbytek, zbytek (5-methoxy-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl) methylesteru prolinu, zbytek 0-pivaloyloxymethylesteru prolinu nebo 4-(pivaloxymethoxykarbonyl) thiazolidin-3-ylový zbytek, přičemž shora uvedené zbytky jsou navázány peptidickou vazbou přes atom dusíku.

Nové sloučeniny obecně obsahují několik center asymetrie a vyskytují se tedy jako diastereomery nebo ve formě jejich racemátu, popřípadě racemických směsí. Vynález zahrnuje jak tyto racemické směsi, tak i jednotlivé diastereomery. Výhodné jsou ty enantiomery, v nichž asymetrické atomy uhlíku mají konfiguraci S.

Výše zmíněné racemáty je možno obvyklým způsobem, například frakční krystalizací, chemickým nebo biochemickým štěpením, obohacovat jednotlivými stereicky jednotnými formami nebo je získat v čistém stavu.

Sloučeniny podle vynálezu existují ve formě svých vnitřních solí (betainů) a mohou tedy tvořit soli jak s kyselinami, tak s bázemi. Jako příklady anorganických bází vhodných k tomuto účelu lze uvést amoniak, hydroxidy alkalických kovů, jako hydroxid sodný nebo draselný, nebo hydroxidy kovů alkalických zemin, jako hydroxid vápenatý nebo hořečnatý, jako vhodné organické báze pak lze uvést N,N'-dibenzylethylendiamin nebo triethylamin. Jako příklady kyselin vhodných k přípravě solí lze uvést halogenovodíkové kyseliny, kyselinu sírovou nebo sulfonové kyseliny.

V souladu s vynálezem se sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I a jejich soli připravují tak, že se sloučeniny obecného vzorce II



ve kterém

R a A mají shora uvedený význam, nechá reagovat s merkaptosloučeninou obecného vzorce III



ve kterém

R_1 má shora uvedený význam, načež se získaná sloučenina obecného vzorce I popřípadě

převeďte na sůl.

Reakce intermediárního bromderivátu obecného vzorce II s merkaptosloučeninou obecného vzorce III se s výhodou provádí v etheru jako reakčním rozpouštědlem. Reakcí s thiooctovou kyselinou se získá odpovídající acetylmerkaptosloučenina, z níž je možno acetylovou skupinu odštěpit působením silné báze.

Výchozí látky obecného vzorce II se připravují z jednotlivých aminokyselin kondezačními reakcemi obvyklými v chemii peptidů, za použití aktivovaných forem příslušných kyselin, popřípadě kondenzačních činidel. Jako skupiny aktivující karboxylovou funkci přicházejí v úvahu zbytky chloridu kyseliny, azidu, anhydridu, p-nitrofenylesteru, kyanmethylesteru apod. Jako kondenzační činidlo se s výhodou používá karbonyldiimidazol, dicyklohexylkarbodiimid, ethoxyacetylen, difenylfosforylazid nebo ester kyseliny chlormravenčí. Reakce se uskutečňují při teplotě mezi 0 °C a +10 °C. Konkrétní přípravy výchozích látek jsou uvedeny v příkladech provedení.

V daném případě se jako výhodné ukázalo použití methylenchloridu jako rozpouštědla společně s dicyklohexylkarbodiimidem a triethylaminem.

Výchozí látky obecného vzorce III jsou známé.

Deriváty aminokyselin obecného vzorce I vykazují silný a dlouhodobý účinek na snižování krevního tlaku, který se zakládá na inhibici enzymu konvertujícího angiotensin I a tím na blokádě tvorby vasokonstrikčně působícího angiotensinu II z angiotensinu I. Mimoto působí sloučeniny podle vynálezu inhibičně na enzym kininazu II, odpovědný za odbourávání bradykininu, kterýžto enzym se pokládá identický a výše zmíněným konvertujícím enzymem. Protože bradykinin působí rozšíření cév, je tímto doplňkovým účinkem hypotenzivní účinek nových sloučenin zesílen. Bradykininem vyvolané snížení krevního tlaku normálních krys je aplikací nových sloučenin zesíleno. Projevem tohoto účinku by rovněž mohl být hypotenzivní účinek pozorovaný u předem neošetřených, geneticky hypertenzivních krys.

U narkotizovaných krys, u nichž byl intravenosním podáním 0,1 mg/kg angiotensinu I zvýšen krevní tlak, vede intravenosní aplikace N-[N^α-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny k dlouhotrvajícímu snížení krevního tlaku o 60 %. N-[N^α-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolin vykazuje při tomto testu 57% účinnost.

N-[N^α-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylová kyselina vykazuje in vitro na enzym konvertující angiotensin I inhibiční aktivitu $IC_{50} = 4,6 \cdot 10^{-9}$ [M]; hodnoty IC_{50} pro N-[N^α-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolin činí $2,7 \cdot 10^{-8}$ [M].

Jako hodnota IC_{50} se označuje taková koncentrace, která z 50 % inhibuje enzym konvertující angiotensin I [viz H. S. Cheung, D. W. Cushman, Biochem. Biophys. Acta 293, 451 (1973)].

K terapeutickému použití se nové sloučeniny mísí s běžnými farmaceutickými plnidly nebo nosnými látkami, pojidly, látkami způsobujícími rozpad tablet, kluznými látkami, zahušťovadly nebo ředidly. Jako farmaceutické formy přicházejí v úvahu například tablety, kapsle, čípky, roztoky, sirupy, emulze nebo dispergovatelné prášky, přičemž tyto lékové formy mohou popřípadě obsahovat další známé účinné látky, například saluretika, diuretika nebo/a angihypertonika.

Vhodné tablety je možno připravit například smísením účinné látky se známými pomocnými látkami, jako jsou například inertní ředidla, jako uhličitán vápenatý, fosforečnan vápenatý nebo mléčný cukr, látky způsobující rozpad tablet, jako kukuřičný škrob nebo alginová kyselina, pojidla, jako škrob nebo želatina, kluzné látky, jako stearát hořečnatý nebo mastek, nebo/a činidla k docílení depotního účinku, jako karboxypolymethylan, karboxymetylcelulosa,

acetátftalát celulosy nebo polyvinylacetát. Tablety mohou sestávat z několika vrstev.

Obdobně je možno vyrábět dražé potahováním jader dražé, připravených analogicky jako tablety, za použití obvyklých činidel používaných k povlékání jader dražé, jako jsou například kolidon nebo šelak, arabská guma, mastek oxid titaničitý nebo cukr. K docílení depotního efektu nebo k zamezení projevů inkompatibility může jádro dražé rovněž sestávat z několika vrstev. Stejně tak i povlaky dražé mohou k dosažení depotního účinku sestávat z několika vrstev. Při výrobě těchto lékových forem je možno používat pomocné látky uvedené výše u přípravy tablet.

Sirupy s obsahem účinných látek, mohou dále obsahovat ještě sladidlo, jako sacharin, cyklamát, glycerin nebo cukr, jakož i látky k zlepšení chuťových vlastností, například aromatické přísady jako vanilin nebo pomerančový extrakt. Tyto sirupy mohou mimoto obsahovat pomocné suspenzační prostředky nebo zahušťovadla, jako natriumkarboxymethylcelulosu, smáčedla, například kondenzační produkty masných alkoholů s ethylenoxidem, nebo ochranné látky, jako p-hydroxybenzoát.

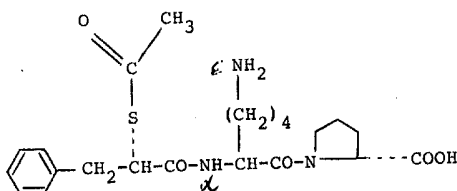
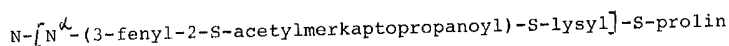
Injekční roztoky se připravují obvyklým způsobem, například za použití konzervačních prostředků, jako p-hydroxybenzoátů, nebo stabilizátorů, jako alkalických solí ethylendiaminotetraoctové kyseliny, a za případku vhodných látek usnadňujících rozpouštění, a plní se jimi injekční lahvičky nebo ampule.

Kapsle obsahující jednu nebo několik účinných látek, popřípadě kombinaci účinných látek, je možno připravit tak, že se účinná látka mísí s inertními nosiči, jako mléčný cukr nebo sorbit, a směsí se plní želatinové kapsle.

Sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu, popřípadě jejich soli se aplikují v denních dávkách pohybujících se od 5 do 500 mg, s výhodou od 10 do 100 mg, přičemž aplikace se může provádět jednou až čtyřikrát denně.

Vynález blíže ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje. Struktura všech syntetizovaných sloučenin v příkladech byla potvrzena NMR spektroskopii.

P ř í k l a d 1



10,7 g (26,7 mmol) terc.butylesteru N-(N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl)-S-prolinu a 6,11 g (26,7 mmol) 3-fenyl-2-R-brompropionové kyseliny se rozpustí ve 270 ml bezvodého dichlormethanu a k roztoku se při teplotě 0 °C za míchání přidá 5,5 g (26,7 mmol) N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti, vysrážený derivát močoviny se odsaje a filtrát se odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí v ethylacelátu a nerozpustné podíly se odfiltrují. Organická fáze se postupně promyje 5% roztokem hydrogensíranu draselného, roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a ethylacelát se oddestiluje ve vakuu. Jako olejovitý zbytek se získá 14 g (85,8 % teorie) produktu tvořeného podle MNR spektroskopie terc.butylesterem N-[N^α-(3-fenyl-2-R-brompropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu.

K zavedení acetylmerkapto skupiny se 3,48 g (45,8 mmol) thiooctové kyseliny rozpustí ve 120 ml bezvodého etheru a 4,62 g (45,8 mmol) triethylaminu a při teplotě 0 °C se k roztoku přidá 14 g (22,9 mmol) bromderivátu získaného výše. Směs se 90 minut zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se nechá přes noc stát, vysrážený triethylamin-hydrobromid se odsaje a filtrát se oddestiluje ve vakuu. Jako zbytek se získá 15,5 g hnědého olejovitého materiálu, který po chromatografickém vyčištění na silikagelu za použití směsi stejných dílů ethylacetátu a n-hexanu jako elučního činidla poskytne 9,4 g (67,7 % teorie) terc. butylesteru N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu.

K zmydelnění terc.butylesteru a současněmu odštěpení N^ε-terc.butoxykarbonylové chránicí skupiny se 5,5 g (9,08 mmol) esteru získaného v předcházejícím odstavci rozpustí ve 150 ml trifluoroctové kyseliny a směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Po oddestilování trifluoroctové kyseliny ve vakuu se zbytek ještě několikrát rozpustí v dichlormethanu a odpaří. Odparek se rozpustí v roztoku hydrogenuhlíčitanu sodného a vytřepe se ethylacetátem. Vodná fáze se okyslí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a dvakrát se extrahuje dichlormethanem. Spojené dichlormethanové extrakty se promyjí vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a po vysušení se oddestilují ve vakuu. Získá se zbytek o hmotnosti 0,5 g. Vodná fáze se nasýtí chloridem sodným a znovu se extrahuje dichlormethanem. Po vysušení síranem hořečnatým a odpaření se získají další 3 g (dohromady 3,5 g) ztuhlého pěnovitěho produktu, který podle NMR spektroskopie strukturně odpovídá sloučenině uvedené v názvu.

$R_f = 0,22$ (silikagel; butanol - kyselina octová - voda 3 : 1 : 1).

P ř í k l a d 2

N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylová kyselina

3,5 g (7,6 mmol) N^ε-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysinu a 1,4 g (7,6 mmol) hydrochloridu methylesteru thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny se rozpustí v 70 ml bezvodého dichlormethanu a k roztoku se za míchání a chlazení na 0 °C přidá nejprve 769 mg (7,6 mmol) triethylaminu a pak 1,6 g (7,6 mmol) n,N'-dicyklohexylkarbodiimidu. Reakční směs se při teplotě místnosti míchá zhruba 17 hodin, pak se vysrážená dicyklohexylmočovina odsaje a rozpouštědlo se oddestiluje. Olejovitý zbytek se rozpustí v ethylacetátu, roztok se po ochlazení znovu zfiltruje a organická fáze se postupně promyje zředěným roztokem hydrogen-síranu draselného, nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po vysušení síranem hořečnatým se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu. Získá se 4,1 g surového olejovitého reakčního produktu, který se vyčistí chromatografií na silikagelu za použití stejných dílů ethylacetátu a n-hexanu jako elučního činidla. Získá se 2,9 g (68,8 % teorie) methylesteru N-[N^ε-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny ve formě ztuhlé pěny, která se krystaluje z etheru.

$R_f = 0,43$ /silikagel; ethylacetát - n-hexan 2 : 1).

K výměně bromu za acetylmerkapto skupinu se k roztoku 792 mg (10,4 mmol) thiooctové kyseliny ve 35 ml bezvodého etheru pod dusíkem a za chlazení ledem pomalu přidá 1,05 g (10,4 mmol) triethylaminu a pak se směs za míchání přikape k roztoku 2,9 g (5,2 mmol) shora získaného bromderivátu ve 20 ml ethylacetátu. Reakční směs se 60 minut zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí, zfiltruje se a roztok se postupně promyje zředěným roztokem hydrogensíranu draselného, roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po vysušení síranem hořečnatým se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu a nažloutlý olejovitý zbytek o hmotnosti 3,3 g se chromatograficky čistí na sloupci 100 g silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu (2 : 1) jako elučního činidla. Získá se 1,9 g (64,1 % teorie) čistého methylesteru N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny ve formě ztuhlé pěny.

$R_f = 0,36$ (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2 : 1).

K odštěpení terc. butoxykarbonylové chránicí skupiny se 1,9 (3, 33 mmol) shora připravené acetylmerkapto-sloučeniny 3 hodiny míchá při teplotě místnosti se 40 ml trifluoroctové kyseliny, pak se směs ve vakuu odpaří k suchu a k odstranění zbylých stop trifluoroctové kyseliny se postupně třikrát za sebou rozpustí v acetonu a chloroformu a znovu odpaří. Získá se 2,7 g methylesteru $N\text{-}[\text{N}^{\omega}\text{-(3-fenyl-2-S-acetyl-merkaptopropanoyl)-S-lysyl}]$ thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny ve formě viskózního oleje.

$R_f = 0,23$ (silikagel; chloroform - methanol - ledová kyselina octová 90 : 10 : 5).

K současnému zmydelnění methylesterového seskupení a esterového zbytku thiooctové kyseliny se 2,7 g (3,3 mmol) shora získaného reakčního produktu rozpustí ve 20 ml methanolu a 40 ml vody, a k roztoku se přidají 4 ml 5N hydroxidu sodného. Po míchání trvajícím 1,5 hodiny se přidají při teplotě místnosti 2 ml 5N hydroxidu sodného a směs se dále míchá ještě 1,5 hodiny. Methanol se oddestiluje ve vakuu, k zbytku se přidá voda a směs se vytřepe dichlormethanem.

Vodná fáze se okyselí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, vyloučený viskózní olej se oddělí v dělicí nálevce, rozpustí se v malém množství vody a vyčistí se chromatografií na 100 g pryskyřice Dowex 50 W x 4, za použití 5% vodného pyridinu jako elučního činidla.

Získá se 700 mg (45,9 % teorie) $N\text{-}[\text{N}^{\omega}\text{-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl}]$ thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny, která je podle NMR spektroskopie čistá.

$R_f = 0,52$ (silikagel; ethylacetát - butanol - voda - kyselina octová 1 : 1 : 1 : 1).

Příprava výchozích látek

$N^{\omega}\text{-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N}^{\epsilon}\text{-terc.butoxykarbonyl-S-lysine}$

3,25 g (14,2 mmol) 3-fenyl-2-R-bromopropionové kyseliny a 3,7 g (14,2 mmol) methylesteru $N^{\epsilon}\text{-terc.butoxykarbonyl-S-lysine}$ se rozpustí v 70 ml bezvodého dichlormethanu, za míchání a chlazení na 0 °C se přidá 2,9 g (14,2 mmol) N,N' -dicyklohexylkarbodiimidu a směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Vysrážená dicyklohexylmočovina se odsaje, rozpouštědlo se oddestiluje a zbytek se vyjme ethylacetátem. Po ochlazení a nové filtraci se organická fáze postupně promyje zředěným roztokem hydrogensíranu draselného, nasyceným roztokem hydrogenuhlitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří se ve vakuu k suchu. Krystalický odparek o hmotnosti 6,2 g poskytne po překrystalování ze směsi ethylacetátu a n-hexanu 4,8 g (71,1 % teorie) methylesteru sloučeniny uvedené v názvu, o teplotě tání 97 až 98 °C.

$R_f = 0,49$ (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2 : 1).

$R_f = 0,7$ (silikagel; chloroform - methanol - ledová kyselina octová 90 : 10 : 5).

K zmydelnění methylesterového seskupení se 4,8 g (10,2 mmol) methylesteru $N^{\omega}\text{-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N}^{\epsilon}\text{-terc.butoxykarbonyl-S-lysine}$ rozpustí v 50 ml methanolu a k roztoku se za chlazení vodou s ledem a za míchání přidá 11 ml 1N louhu sodného (11 mmol). Po tříhodinovém míchání při teplotě místnosti se methanol odpaří ve vakuu, vodný odparek se zředí vodou a vzniklý zakalený roztok se po okyselení 5% roztokem hydrogensíranu draselného extrahuje dichlormethanem. Krystalický produkt vyloučení z dichlormethanového roztoku se odsaje (2,32 g) a z filtrátu se získají ještě další 2 g krystalického materiálu. Obě tyto frakce se spojí a překrystalizují se z chloroformu s malým množstvím methanolu. Získá se 3,1 g (66,4 % teorie) sloučeniny uvedené v názvu, tající za rokladu při 178 až 179 °C.

$R_f = 0,55$ (silikagel; chloroform - methanol - ledová kyselina octová 90 : 10 : 5).

P ř í k l a d 3

N -[N^X -(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-S-lysyl]-thiazolidin-4-S-karboxylová kyselina.

S-acetylderivát sloučeniny uvedené v názvu příkladu 2 se získá opakováním postupu popsaného v příkladu 2 s tím rozdílem, že se použije namísto thiazolidinmethylesteru příslušného terc.butylesteru thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny a v jediném reakčním stupni se působením trifluoroctové kyseliny zmýdelní terc.butylesterové seskupení v reakčním produktu za současného odštěpení chránicí skupiny na koncovém dusíku.

P ř í k l a d 4

N -[N^L -(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolin

K roztoku 0,989 g (13 mmol) thiolactové kyseliny ve 45 ml bezvodého etheru a 1,31 g (13 mmol) triethylaminu se pod dusíkem za míchání přikape roztok 3,7 g (6,5 mmol) methylesteru N -[N^X -(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)- N^E -terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu ve 30 ml ethylacetátu. Reakční směs se zahřeje k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí, zfiltruje se a filtrát se postupně promyje zředěným roztokem hydrogensíranu draselného, roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu. Jako zbytek se získá 4,0 g nažloutlého oleje, který se vyčistí chromatografií na 120 g silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu (2 : 1) jako elučního činidla. Tímto způsobem se získá 3,0 g (81,9 % teorie) čistého methylesteru N -[N^X -(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)- N^E -terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu ve formě bezbarvého oleje.

R_f = 0,26 (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2 : 1).

Odštěpením chránicích skupin postupem popsaným v příkladu 2 se získá 1,7 g (78,7 % teorie) sloučeniny uvedené v názvu.

R_f = 0,52 (silikagel; ethylacetát - butanol - voda - kyselina octová 1 : 1 : 1 : 1).

P ř í k l a d 5

RSS-diastereomer analogický produktu připravenému v příkladu 4 se získá tak, že se jako výchozí látka použije R-bromderivát odpovídajícího S-isomeru, tj. methylester N -[N^X -(3-fenyl-2-S-bromopropanoyl)- N^E -terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu.

R_f = 0,44 (silikagel; n-butanol - ledová kyselina octová - voda 3 : 1 : 1).

P ř í k l a d 6

(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylester N -[N^X -(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolinu

A. 2,6 g (4,7 mmol) N -[N^X -(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)- N^E -terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu se rozpustí ve 400 ml acetonu a k roztoku se postupně přidá 500,5 mg (5 mmol) hydrogenuhličitanu draselného, 141 mg (0,85 mmol) jodidu draselného a 965 mg (5 mmol) 4-brom-methyl-5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolenu. Reakční roztok se v dusíkové atmosféře za míchání 3 hodiny zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí a filtrací se zbaví nerozpustných podílů. Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek se rozpustí v ethylacetátu, roztok se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a ethylacetát se oddestiluje ve vakuu. Odparek o hmotnosti 2,8 g se vyčistí chromatografií na 90 g silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu

(2 : 1) jako elučního činidla. Získá se 2,3 g (73,4 % teorie) olejovitého produktu, který podle NMR spektroskopie odpovídá příslušnému (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylesteru prolinu.

$R_f = 0,68$ (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2 : 1).

B. K výměně bromu za acetylmerkaptoskupinu se k roztoku 525 mg (6,9 mmol) thioloctové kyseliny ve 20 ml bezvodého etheru v dusíkové atmosféře za chlazení ledem pomalu přidá 0,7 g (6,9 mmol) triethylaminu a výsledný roztok se za míchání přikape k roztoku 2,3 g (3,5 mmol) shora uvedeného bromderivátu ve 20 ml bezvodého etheru a 10 ml ethylacetátu. Reakční směs se ještě 90 minut zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí, zfiltruje se a filtrát se postupně promyje zředěným roztokem hydrogensíranu draselného, roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po vysušení síranem hořečnatým se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu. Jako zbytek se získá 2,3 g nažloutlého oleje, který po chromatografickém vyčištění na 7,5 g silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu (2 : 1) jako elučního činidla poskytne 1,7 g (74,4 % teorie) (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylesteru N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-N^ε-terc.-butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu.

C. K odštěpení N^ε-terc.butoxykarbonylové chránicí skupiny lysinového zbytku se 1,7 g (2,57 mmol) produktu připraveného ve stupni B 3 hodiny míchá při teplotě v místnosti se 40 ml trifluoroctové kyseliny, pak se směs odpaří ve vakuu k suchu a zbytek se k odstranění zbylé trifluoroctové kyseliny postupně třikrát za sebou rozpustí v acetonu a chloroformu a znovu odpaří. Získá se 2,3 g sloučeniny uvedené v názvu.

P ř í k l a d 7

N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-N^ε-terc.-butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolin

3,9 g (6,9 mmol) methylesteru N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu (syntetisován postupem podle příkladu 2) se zmydelní tříhodinovou reakcí v dusíkové atmosféře při teplotě místnosti s 10,5 ml 5N hydroxidu sodného ve 40 ml 50 % vodného methanolu.

Získá se 2,9 g sloučeniny uvedené v názvu, ve formě bílé amorfnní pevné látky.

$R_f = 0,57$ (silikagel; chloroform-methanol - ledová kyselina octová 90:10:5).

P ř í k l a d 8

(5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu

A. Methylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu

Sloučenina uvedená v názvu se připraví z 13,2 g (28,9 mmol) N^ε-(3-fenyl-2-bromopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysinu a 4,8 g (28,9 mmol) hydrochloridu methylesteru S-prolinu kondenzační metodou popsanou v příkladu 2, za použití N,N'-dicyklokarbodiimidu jako kondenzačního činidla.

Získá se 12,8 g surového olejovitého reakčního produktu, který po chromatografickém vyčištění (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2:1) poskytne 8,9 g (54 % teorie) žádané sloučeniny ve formě amorfnní pevné látky.

B. K zmydelnění methylesteru uvedeného v názvu odstavce A se 4 g (7 mmol) této slouče-

niny rozpustí ve 40 ml methanolu, přidá se 7,5 ml (7,5 mmol) 1N hydroxidu sodného a směs se 3 hodiny míchá při teplotě místnosti. Methanol se oddestiluje ve vakuu, zbytek se zředí vodou a okyslí se zředěným roztokem hydrogensíranu draselného. Vyloučený pevný materiál se odsaje a po promytí vodou se vysuší ve vakuu nad oxidem fosforečným.

Výtěžek produktu činí 3,4 g (87,6 % teorie).

$R_f = 0,6$ (silikagel; chloroform - methanol - ledová kyselina octová 90:10:5).

C. (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-R-bromopropanoyl)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-S-lysyl]-S-prolinu

2,6 g (4,7 mmol) kyseliny připravené v odstavci B se rozpustí ve 40 ml acetonu a k roztoku se postupně přidá 500,5 mg (5 mmol) hydrogenuhlčitanu draselného, 141 mg (0,85 mmol) jodidu draselného a 965 mg (5 mmol) 4-brommethyl-5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolenu. Reakční roztok se v dusíkové atmosféře za míchání 3 hodiny zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí a filtrací se zbaví vysráženého chloridu draselného. Filtrát se odpaří ve vakuu, zbytek se rozpustí v ethylacetátu, roztok se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a ethylacetát se oddestiluje ve vakuu. Olejovitý odparek o hmotnosti 2,8 g se vyčistí chromatografií na silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu (2:1) jako elučního činidla. Získá se 2,3 g (73,4 % teorie) olejovitého produktu, který podle NMR spektroskopie odpovídá sloučenině uvedené v názvu.

$R_f = 0,68$ (silikagel; ethylacetát - n-hexan 2:1).

D. (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkapt)-N^ε-terc.butoxykarbonyl-L-lysyl]-S-prolinu

K roztoku 525 mg (6,9 mmol) thiooctové kyseliny ve 20 ml bezvodého etheru se v dusíkové atmosféře za chlazení ledem pomalu přidá 700 mg (6,9 mmol) triethylaminu a pak se k němu za míchání přikape roztok 2,3 g (3,45 mmol) bromderivátu z odstavce C ve 20 ml bezvodého etheru a 10 ml ethylacetátu. Reakční směs se ještě 90 minut zahřívá k varu pod zpětným chladičem, pak se ochladí, zfiltruje se a filtrát se postupně promyje zředěným roztokem hydrogensíranu draselného, roztokem hydrogenuhlčitanu sodného, vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Po vysušení síranem hořečnatým se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu. Jako zbytek se získá 2,3 g oleje, který po chromatografickém vyčištění na silikagelu za použití směsi ethylacetátu a n-hexanu (2:1) jako elučního činidla poskytne 1,7 g (74,4 % teorie) sloučeniny uvedené v názvu, ve formě bezbarvého viskózního oleje.

$R_f = 0,21$ (ethylacetát - n-hexan 2:1).

Analogickým způsobem jako v předcházejících příkladech lze rovněž připravit následující sloučeniny:

N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-merkaptopropanoyl)-N^ε-acetyl-S-lysyl]-S-prolin;

$R_f = 0,49$ (silikagel; butanol - kyselina octová - voda 3:2:1);

pivaloyloxymethylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetylmerkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolinu;

$R_f = 0,36$ (silikagel; ethylacetát - methanol 9:1).

pivaloyloxymethylester N-[N^ε-(3-fenyl-2-S-acetyl-merkaptopropanoyl)-S-lysyl]thiazolidin-4-S-karboxylové kyseliny.

RSS-diastercomery analogické sloučeninám uvedeným výše, konkrétně N -[N^N -(3-fenyl-2-R-
-acetylmerkaptopropanoyl)-S-lysyl]-S-prolin a N -[N^N -(3-fenyl-2-R-merkaptopropanoyl)- N^N -
-acetyl-S-lysyl]-S-prolin, se získají tak, že se jako výchozí materiál použije namísto
R-bromderivátu odpovídající S-isomer, tj. 3-fenyl-2-S-brompropionová kyselina.

V následující části jsou uvedeny příklady složení a přípravy farmaceutických prostředků
obsahujících sloučeniny podle vynálezu.

a) Dražé

Jedno jádro dražé obsahuje:

účinná látka podle vynálezu	10,0 mg
mléčný cukr	60,0 mg
kukuřičný škrob	35,0 mg
želatina	3,0 mg
stearát hořečnatý	2,0 mg
celkem	110,0 mg

Příprava:

Směs účinné látky s mléčným cukrem a kukuřičným škrobem se po ovlhčení 10% vodným roz-
tokem želatiny granulují přes síto o velikosti ok 1 mm, granulát se vysuší při teplotě
40 °C a znovu se protluče sítem. Výsledný granulát se smísí se stearátem hořečnatým a ze
směsi se vylisují jádra dražé. Takto získaná jádra se obvyklým způsobem potahují za pomoci
vodné suspenze cukru, oxidu titaničitého, mastku a arabské gumy. Hotová dražé se pak vyleští
včelím voskem.

b) Tablety

Složení:

účinná látka podle vynálezu	10,0 mg
mléčný cukr	70,0 mg
kukuřičný škrob	50,0 mg
rozpustný škrob	7,0 mg
stearát hořečnatý	3,0 mg
celkem	140,0 mg

Příprava:

Účinná látka a stearát hořečnatý se za použití vodného roztoku rozpustného škrobu
granulují, granulát se vysuší a důkladně se promísí s mléčným cukrem a kukuřičným škrobem.
Ze směsi se pak lisují tablety o hmotnosti 230 mg, z nichž každá obsahuje 100 mg účinné
látky.

c) Injekční roztok

Složení:

účinná látka podle vynálezu	5,0 mg
ethanolamin	60,0 mg
chlorid sodný	20,0 mg
destilovaná voda doplnit do	2 ml

Příprava:

Účinná látka spolu s pomocnými látkami se rozpustí v dostatečném množství destilované vody a potřebným množstvím vody se doplní na žádanou koncentraci. Roztok se zfiltruje a za aseptických podmínek se jím plní ampule o objemu 2 ml. Ampule se sterilizují a uzavřou. Každá ampule obsahuje 5 mg účinné látky.

d) Kapsle

Složení:

účinná látka podle vynálezu	10,0 mg
mléčný cukr	250,0 mg
kukuřičný škrob	40,0 mg
mastek	10,0 mg
celkem	310,0 mg

Příprava:

Účinná látka, mléčný cukr a kukuřičný škrob se nejprve smísí ve vhodné míchačce a směs se pak rozele v mlýnu. Výsledná směs se znovu přenesse do míchačky, důkladně se promísí s mastkem a strojově se plní do tvrdých želatinových kapslí.

e) Čípky

Složení:

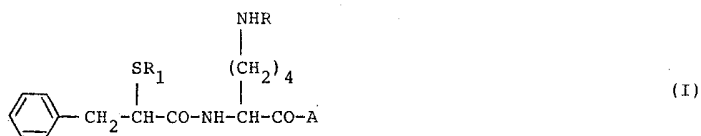
účinná látka podle vynálezu	0,1 g
kakaové máslo (teplota tání 36 až 37 °C)	1,6 g
karnaubský vosk	0,1 g
celkem	1,8 g

Příprava:

Kakaové máslo a karnaubský vosk se roztaví, důkladně se promísí a ochladí se na 45 °C. Do této hmoty se vmíchá jemně rozpráškovaná účinná látka, směs se pak lije do mírně předchlazených čípkových forem vhodné velikosti a nechá se zchladnout.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob výroby derivátů aminokyselin obecného vzorce I

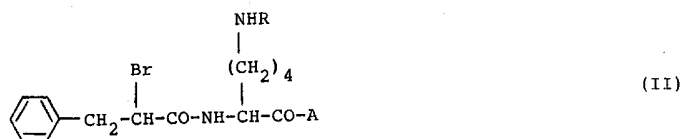


ve kterém

R₁ znamená atom vodíku nebo acetylovou skupinu,

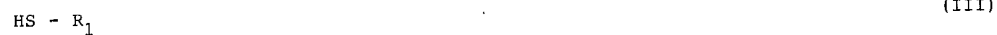
R představuje atom vodíku, acetylovou skupinu nebo terc.butoxykarbonylovou skupinu a

A znamená zbytek prolinu, 4-karboxythiazolidin-3-ylový zbytek, zbytek (5-methyl-2-oxo-1,3 dioxolen-4-yl)methylesteru prolinu, zbytek 0-pivaloyloxymethylesteru prolinu nebo 4-(pivaloyloxymethoxykarbonyl)thiazolidin-3-ylový zbytek, přičemž shora uvedené zbytky jsou navázány peptidickou vazbou přes atom dusíku a jejich solí, vyznačující se tím, že se sloučenina obecného vzorce II



ve kterém

R a A mají shora uvedený význam, nechá reagovat s merkaptosloučeninou obecného vzorce III



ve kterém

R_1 má shora uvedený význam a výsledná sloučenina obecného vzorce I se popřípadě převede na sůl.