



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

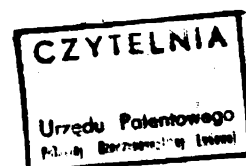
Zgłoszono: 04.06.79 (P. 216083)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.12.80

Opis patentowy opublikowano: 30.04.1984

Int. Cl.³
C07C 103/52



Twórca wynalazku: Andrzej Lipkowski, Stefania Drabarek

Uprawniony z patentu: Uniwersytet Warszawski, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania amidu pyroglutamylo-(3'-aminotyrozylo)-proliny

1

Dziedzina techniki. Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania amidu pyroglutamylo-(3'-aminotyrozylo)-proliny, o wzorze przedstawionym na rysunku. Wytworzony amid wykazuje właściwości farmakologiczne i nadaje się do stosowania przy wytwarzaniu stymulatorów i lub inhibitorów wydzielania neurohormonów z gruczołowej części przysadki mózgowej.

Stan techniki. W ostatnich latach opisano szereg występujących w mózgu peptydów o silnym działaniu stymulującym lub inhibitującym wydzielanie hormonów z gruczołowej części przysadki mózgowej. Jako neurohormon stymulujący wydzielanie hormonu tyreotropowego opisano naturalny peptyd w postaci amidu pyroglutamylo-histydinylo-proliny.

Jako peptyd inhibitujący naturalny neurohormon zsyntetyzowano jedynie amid pyroglutamylo-3,4-dwuhydroksyfenyloalanylo-proliny.

Niedogodność stosowania tego znanego peptydu wynika stąd, że reszta zasadowego aminokwasu histydyny jest w tym analogu podstawiana resztą słabokwaśnego fenolu w postaci 3,4-dwuhydroksyfenylo-alaniny, więc powinowactwo do odpowiednich receptorów, charakterystycznych dla hormonu tyreotropowego jest małe i powoduje, że znany peptyd wykazuje stosunkowo słabe właściwości inhibitorowe. Dodatkową niedogodnością stosowania znanego peptydu jest trudna synteza związków zawierających w łańcuchu peptydowym resztę dwuhydroksyfenyloalaninową.

2

Istota wynalazku. Sposób według wynalazku wytwarzania amidu pyroglutamylo-(3'-aminotyrozylo)-proliny, o wzorze przedstawionym na rysunku, polega na dołączaniu znanymi sposobami tworzenia wiązania peptydowego do amidu proliny reszty 3'-nitrotyrozyny, zwłaszcza z grupą aminową chronioną przy pomocy grupy butyloksykarbonylowej, benzyloksykarbonylowej lub formylowej, a następnie, po usunięciu znanymi sposobami grup blokujących, do tak utworzonego dwupeptydu przyłącza się resztę kwasu pyroglutaminowego, znanymi sposobami tworzenia wiązania peptydowego, zwłaszcza mieszanych bezwodników, metodą dwucykloheksylokarbodwuimidową lub metodą estrów aktywnych. Tak wytworzony trójpetyd z grupą nitrową redukuje się wodorem w obecności palladu osadzonego na węglu, lub cynkiem w środowisku kwaśnym, lub prądem stałym, korzystnie o natężeniu 2 do 5 A.

Przykładową syntezę zilustrowano schematem przedstawionym na rysunku.

Zaletą sposobu według wynalazku wytwarzania amidu pyroglutamylo-(3'-aminotyrozylo)-proliny jest prostota wytwarzania, w wyniku której otrzymuje się peptyd wykazujący właściwości zasadowe, zbliżone do właściwości naturalnego hormonu tyreotropowego, o potencjale utleniająco redukującym, identycznym z potencjałem utleniająco-redukcyjnym amidu pyroglutamylo-3',4'-dwuhydroksyfenyloalanyloproliny.

Przykład. Do roztworu 1 mmola chlorowodor-

ku amidu proliny w chlorku metylenu dodano kolejno podczas intensywnego mieszania 1 mmol trójetyleaminy, 1 mmol N-hydroksybenzotriazolu i 1 mmol N-t-butyloksykarbonylo-3'-nitrotyrozyny. Po oziębieniu otrzymanego roztworu do -10°C dodano do roztworu 1 mmol N,N'-dwucykloheksylokarbodwuimidu. Po 1 godzinie mieszania w temperaturze -10°C roztwór ogrzano do temperatury pokojowej, a po następnych 4 godzinach odsączono wytrącony N,N'-dwucykloheksylomocznik. Roztwór przemyto kolejno 1% NaHCO_3 , wodą, 10% kwasem cytrynowym i ponownie wodą.

Po wysuszeniu roztworu siarczanem magnezu, chlorek metylenu odparowano in vacuo. Pozostały osad krystalizowano z układu octan etylu/eter. Otrzymano żółte kryształy amidu N-t-butyloksykarbonylo-3'-nitrotyrozylo-proliny o następujących współczynnikach R_f na żelu krzemionkowym:

R_f^1 (15% metanol w chloroformie)	= 0,68
R_f^2 (25% metanol w chloroformie)	= 0,85
R_f^3 (33% metanol w chloroformie)	= 0,90
R_f^4 (n-butanol, kwas octowy, woda — 4 : 1 : 1)	= 0,78

uzyskując 80 do 85% wydajności i temperaturę topnienia 112 do 115°C .

1 mmol tak otrzymanego amidu N-t-butyloksykarbonylo-3'-nitrotyrozyloproliny wstrząsano 15 minut w temperaturze pokojowej z 4 N chlorowodem w octanie etylu, a następnie chlorowodór i octan etylu odparowano in vacuo. Pozostałość w postaci osadu rozarto z eterem, odsączono eter i higroskopijną pozostałość suszono nad wodorotlenkiem potasu.

Pozostałość rozpuszczono w mieszaninie chlorku metylenu z dwumetyloformamidem i dodano kolejno 1 mmol trójetyleaminy, 1 mmol estru 2,4,5-trójklorofenyłowego kwasu pyroglutaminowego i 0,1 mmola N-hydroksybenzotriazolu. Po 4 godzinach odparowano chlorek metylenu in vacuo, a do pozostałości dodano eteru. Wytrąsany osad oczyszczono chromatograficznie na żelu krzemionkowym w układzie 25% metanolu w chloroformie. Główną frakcję wyodrębniono, a rozpuszczalnik odparowano. Otrzymano żółte kryształy o składzie elementarnym zgodnym z wzorem dla amidu pyroglutamylo-3'-nitrotyrozylo-proliny o następujących współczynnikach R_f na żelu krzemionkowym:

R_f^1	= 0,31
R_f^2	= 0,52
R_f^3	= 0,69
R_f^4	= 0,48

uzyskując 75 do 80% wydajności i temperaturę topnienia 215 do 220°C .

1 mmol tak uzyskanego amidu pyroglutamylo-3'-nitrotyrozylo-proliny rozpuszczono w metanolu i dodano 5 mmoli lodowatego kwasu octowego i jako katalizatora 50 mg palladu osadzonego na węglu, a następnie przez mieszaninę przepuszczono wodór, aż do całkowitego zaniku żółtej barwy roztworu. Katalizator odsączono, a przesącz zateżono in vacuo.

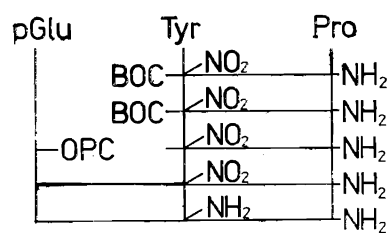
Do pozostałości dodano eteru, a wytrącony osad odsączono i wysuszono nad wodorotlenkiem sodu. Otrzymano analitycznie czysty amid pyroglutamylo-3'-aminotyrozylo-proliny o następujących współczynnikach R_f na żelu krzemionkowym:

R_f^1	= 0,1
R_f^2	= 0,25
R_f^3	= 0,55
R_f^4	= 0,27

uzyskując w procesie 90 do 95% wydajności i preparat o temperaturze topnienia od 196 do 198°C .

Zastrzeżenia patentowe

Sposób wytwarzania amidu pyroglutamylo-(3'-aminotyrozylo)-proliny, o wzorze przedstawionym na rysunku, **znamienny tym**, że do amidu proliny dołącza się znanym sposobem tworzenia wiązania peptydowego resztę 3'-nitrotyrozyny z grupą aminową chronioną przy pomocy grupy butyloksykarbonylowej, benzyloksykarbonylowej lub formylowej, a następnie, po usunięciu znanymi sposobami grup blokujących, do tak utworzonego dwupeptydu przyłącza się resztę kwasu pyroglutaminowego, znanymi sposobami tworzenia wiązania peptydowego, zwłaszcza mieszanych bezwodników, metodą dwucykloheksylokarbodwuimidową lub metodą estrów aktywnych i tak wytworzony trójepeptyd z grupą nitrową redukuje się wodorem w obecności palladu osadzonego na węglu, lub cynkiem w środowisku kwaśnym, lub prądem stałym, korzystnie o natężeniu 2 do 5 A.



Schemat

