

SZABADALMI LEÍRÁS

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

(11)

196833

B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,

CO7K 5/02

CO7K 7/02

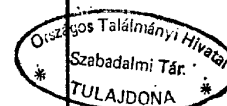
A 61 K 37/64

A bejelentés napja: (22) 85.03.12. (21) (911/85)

A bejelentés elsőbbsége: (33) US
(32) 84.03.12.
(31) (588 279)

A közzététel napja: (41) (42) 85.12.30.

Megjelent: (45) 1989. 09. 04.



Feltaláló(k): (72)

BINDRA Jasjit Singh, KLEINMAN Edward
Fox, Groton, ROSATI Robert Louis, Stonington,
Connecticut, US

Szabadalmaz: (73)

Pfizer Inc., New York, US

(54)

Eljárás sztatin vagy származékait tartalmazó
peptidszármazékok előállítására

(57)KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az új (I) általános képletű peptid-származékok és gyógyászati szempontból alkalmazható sóik – ahol

W jelentése L-fenilalanin,

W¹ jelentése L-hisztidin vagy N-metil-hisztidin,

R¹ jelentése 1-6 szénatomos alkoxi-karbonil-csoport,

R² jelentése izobutil- vagy ciklohexil-metilén-csoport

R³ jelentése hidroxil- vagy aminocsoport és

R¹ jelentése:

(i) A-PHe-OH, ahol

A jelentése L-lizin vagy L-izoleucin,

(ii) L-izolencin-(4-amino-/4-szek-butyl/)-vajsav,
4-amino-/4-szek-butyl/)-vajsav,

L-alanin-sztatin-L-glutaminsav,

/amino-2-szek-butyl-etilén/-L-fenilalanin,

(iii) 1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-2-il-csoport,

(iv) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(v) L-prolin-(1-4 szénatomos)-alkilészter

(vi) 1,2,3,4,5,6,7,8-dekahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(vii) 4-(fenil-metil)-piperidin-1-il-csoport,

(viii) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(amino-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(ix) 1,2,3,4-tetrahidro-kinolin-1-il-csoport,

(x) L-lizin-sztatin, vagy

(xi) N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid-előállítására.

A találmány szerint előállított vegyületek renin-gátló hatásúak.

A renint, ezt a 40 000 molekulasúlyú fehérje-hasító enzimet, a vese termeli és választja ki a vérbe. A renin in vivo hasítja a plazmában található angiotenzinogén glikoproteint. A humán angiotenzinogén esetében ez az N-terminális végen, a leucin (10) és a valin (11) között történik:

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1 2 3 4 5 6 7 8

Leu Val Ile His Ser Glu
10 11 12 13 14 15

Az így keletkezett, a vérkeringésben levő N-terminális decapeptidet (angiotenzin I) a szervezet ezt követően az angiotenzin II-ként ismert oktapeptiddé bontja. Az angiotenzin II-ről ismert, hogy a vérnyomás jelentős emelkedését képes kiváltani, vélhetően úgy, hogy a véredények összehúzódását és a nátriumot visszatartó aldoszteron hormonnak a mellékveséből történő kijutását okozza. Ezáltal a renin-angiotenzinogén rendszer okozati tényezőként szerepelhet a magas vérnyomás bizonyos fajtái esetében.

A renin-angiotenzinogén rendszer nem kívánatos hatásának csökkentésére szolgáló egyik mód az, hogy olyan anyagot juttatunk a szervezetbe, mely gátolja a renin angiotenzinogént hasító tevékenységét. Számos ilyen anyag ismeretes, ide értve az antirenin-antitesteket, a pepsztatint és a természetben előforduló foszfolipideket.

A 45.665 számú európai szabadalom (közöttéve 1982. február 2-án) egy sor reningátló polipeptid-származékot közöl, melyek általános képlete:

X-Y-Pro Phe His-A-B-Z-W,

ahol, X jelentése hidrogénatom vagy aminocsoport védő csoport, Y hiányozhat, B jelentése lipofil aminosav, Z jelentése aromás aminosav, W jelentése lehet hidroxilcsoport és A jelentése többek között egy

$-NH-CH(R^1)-CH(OH)-CH(R^2)-C(O)-$ általános képletű csoport lehet, ahol R^1 és R^2 jelentése lipofil vagy armás oldallánc. A közölt szabadalmi bejelentésben kifejtett meghatározások szerint, ez nem jelenti azt, hogy az A vagy a Z sztatín és, hogy a B lizin lenne.

A 77 028. számú európai szabadalom (közöttéve 1983. április 20-án) egy sor olyan reningátló polipeptidet közöl, melyek nem-terminális sztatint vagy sztatinszármazékot tartalmaznak. Ezek között szerepelnek olyan vegyületek, melyek fenilalanin-hisztidin-sztatín szekvenciával rendelkeznek. A közölt szabadalmi bejelentés viszont nem nyilvánítja ki a lizinnek közvetlenül a -Phe-His-Sta- szekvencia utáni elhelyezését.

Felismertük, hogy bizonyos új vegyületek renin-gátlóként alkalmazhatók. Ezek az új vegyületek az (I) általános képletű polipeptid és polipeptid-származékok, ahol

W jelentése L-fenilalanin,

W^1 jelentése L-hisztidin vagy N-metil-L-hisztidin,

R¹ jelentése 1-6 szénatomos alkoxi-karbonil-csoport,

R² jelentése izobutil- vagy ciklohexil-metilén-csoport és

R³ jelentése hidroxil- vagy aminocsoport,

R¹ jelentése,

(i) A Phe-OH, ahol

A jelentése L-lizin vagy L-izoleucin,

(ii) L-izoleucin-sztatín,

L-izolencin-(4-amino)-vajsav,

4-amino-(h-szek-butil)-vajsav,

L-alanin-sztatín-L-glutaminsav,

(amino-2-szek-butil-etilén)-L-fenilalanin.

(iii) 1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-2-il-csoport,

(iv) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(v) L-prolin-(1-4 szénatomos)-alkilészter,

(vi) 1,2,3,4,5,6,7,8-dekahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(vii) 4-(fenil-metil)-piperidin-1-il-csoport,

(viii) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(amino-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

(ix) 1,2,3,4-tetrahidro-kinolin-1-il-csoport,

(x) L-lizin-sztatín, vagy

(xi) N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid,

illetve ezek gyógyászati szempontból alkalmazható só előállítására vonatkoznak.

Különösen előnyösek azok a vegyületek, ahol W jelentése L-fenilalanin, W^1 jelentése a W csoport-hoz peptidkötéssel kapcsolt L-hisztidin, és R^3 jelentése hidroxilcsoport.

A találmány szerint előállított vegyületek antihipertenzív hatásúak in vivo emlősnél és az ember-nél. Ez a hatás legalábbis jelentős részben abból ered, hogy gátolják az angiotenzinek renin által történő hasítását. Noha a következő mechanizmus elmélettel nem kívánunk korlátozni, valószínűnek látszik, hogy e vegyületek reningátló hatása a reninhez történő szelektív kötődésüknél ered (az angiotenzinogénhez viszonyítva). Alacsony molekulasúlyuk miatt e vegyületek könnyösen oldódnak vízben, így szájon keresztül adagolhatók, ezen kívül szintézisük kereskedelmielg elfogadható áron megoldható. A találmányban szereplő vegyületek diuretikumként is alkalmazhatók.

A „gyógyászati szempontból alkalmazható” sók kifejezésén azt értjük, hogy ezek a sók a bevitt dózisban nem toxikusak. Minthogy a találmány vegyületei bázikus és savas csoportokat egyaránt tartalmaznak, savaddíciós és bázisaddíciós sóik egyaránt lehetségesek.

Gyógyászati szempontból alkalmazható savaddíciós só lehet például a hidroklorid, hidrobromid, hidrojodid, szulfát, hidrogénszulfát, foszfát, hidrogén-foszfát, acetát, laktát, maleát, mezilát, fumarát, citrát, hidrogén-citrát, tartarát, hidrogéntartarát, szukcinát, glukonát és szacharát. Gyógyászati szempontból alkalmazható bázisaddíciós só lehet például a nátrium-, kálium-, kalcium- és magnézium-só. A savaddíciós és bázisaddíciós sók előállítására az ismert eljárásokat alkalmazhatjuk.

Az (I) általános képlet N-terminális végéhez kapcsolódó R csoport előnyösen t-butil-oxi-karbonil-csoport.

A találmány szerinti vegyületek egyik előnyös csoportja az, ahol R^3 jelentése hidroxilcsoport, R^2 jelentése izobutilcsoport, vagy még előnyösebben ciklohexil(metilén)-csoport, úgy, hogy az $-NH-CH(R^2)-CH(R^3)-CH_2-CO$ ezáltal sztatín vagy ciklo-sztatín lesz, W^1 jelentése a W-hez peptidkötéssel kötött L-hisztidin és R^1 jelentése -Lys-B. Lizinnek közvetlenül a -fenilalanin-hisztidin-sztatín- (vagy ciklo-sztatín)- után behelyezése az in vivo reningátló

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

hatás meglepően jelentős meghosszabbodását eredményezi.

Különösen előnyösek az alábbi vegyületek és ezek gyógyászati szempontból alkalmazható sóik:

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklo-sztatín-lizin-fenilalanin,

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-lizin-fenilalanin,

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-alanin-sztatín-glutaminsav,

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklo-sztatín-(amino(2-szek-butil-etilén)-fenilalanin),

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-(amino(2-szek-butil-etilén)-fenilalanin),

(N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklo-sztatín-1,2,3,4-tetrahidro-2-izokinolin,

és (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklo-sztatín-lizin-sztatín.

A találmányban szereplő vegyületek az ismert eljárások szerint előállíthatók. Az előnyös szintézis alaplépése egy aminosav nem-védett α -amino-csoportjának acilezése olyan aminosavval, melynek karboxil-csoportja az acilezés szempontjából aktivált és saját α -nitrogénatomja megfelelő csoporttal védett, peptidkötést alakítva ki ezáltal a két aminosav között, amit az említett védőcsoportok eltávolítása követ. Az összekapcsolás/védőcsoport eltávolítás szintetikus alaplépést megismételve, polipeptidet építünk fel a molekula C-terminális végétől kiindulva és az N-terminális véget kialakítva. A találmányban szereplő vegyületek szintézisében felhasznált aminosavak (mint szabad sav, sók, észterek, stb.) kereskedelmi forgalomból beszerezhetők akár védett, akár szabad α -amino-csoporttal rendelkező formában. A sztatín-N-(t-butil-oxi-karbonil)-sztatín formájában a kereskedelemben beszerezhető, illetve szabad sav vagy észterezett állapotban elő is állítható az irodalomban közölt eljárások alapján (lásd például: 4 397 786 számú US. szabadalmi leírás és Rich, D. H. és munkatársai, J. Org. Chem., (1978), 43, 3624). Az így előállítható sztatín gamma-aminocsoportja egyaránt lehet védett vagy szabad. Ha kívánt, az első kapcsolási lépésnél egy megfelelő, nem védett aminocsoportú aminosavanalógot (szabad savként, sóként vagy észterként, stb.) is használhatunk, például 4-amino-vajsavat, 4-amino-valeriánsavat vagy 4-amino-4-szek-butil-vajsavat. A sztatín megfelelő származékát a szokásos szintetikus eljárásokkal állíthatjuk elő. Így például, az itt aminosztatinként említett $H_2N-CH(i\text{-izobutil})-CH_2-CH(NH_2)-CH_2-COOH$ származékot mindkét aminocsoportján védett állapotban az alábbiak szerint állíthatjuk elő, a védett aminocsoportú sztatín-észtert szulfonil-kloriddal reagáltatjuk, a nyert szulfonát észtert nátrium-aziddal reagáltatva, védett aminocsoportú 4-izobutil-2-buténsav-észtert és védett aminocsoportú 4-izobutil-3-azido-vajsavésztert kapunk. A telítetlen savszármazékot egy primer aminnal reagáltatva és/vagy az azido vegyületet hidrogénezzve, majd a kapott köztitermékeket egy aldehid jelenlétében alkálifém-hidriddel redukálva, mindkét esetben a vajsav 4-izobutil-3-szek-amino-származéka keletkezik, amit hidrogénezzünk, majd bázikus körülmények között savhalogéniddal reagáltatunk.

A II rész képletű, N-védett ciklo-sztatín vegyületeket úgy állíthatjuk elő, hogy a Rich D. H. és munkatársai (J. Med. Chem., (1980), 23 (1), 27-33) szerint

elkészített védett aminocsoportú 4-amino-4-fenil-metil-3-hidroxi-vajsavat hidrogénezzük.

A találmányban szereplő vegyületeknek a renin angiotenzinogént hasító működésére kifejtett gátló hatását tanulmányozhatjuk: 1) mennyire képesek in vitro gátolni az angiotenzinogén hasítást és 2) mennyire képesek in vivo antagonizálni az exogén, renin által kiváltott vérnyomásemelkedést.

A találmányban szereplő vérnyomáscsökkentő szereket előnyösen orálisan adagoljuk, mert ez a beteg számára kellemesebb és kényelmesebb, de bejuttathatjuk parenterálisan is. Orális adagolásnál a napi dózis általában 0,1 mg és 10 mg között van testsúly kilogrammonként, ezt szükség szerint változtathatjuk a beteg állapotától és a beadott anyagtól függően. Általában alacsony napi dózissal kezdjük a kezelést, és ha szükséges az orvos növelheti az adagot. Megjegyzendő, hogy ezek a vegyületek gyógyászati szempontból alkalmazható kísérőanyagokkal is bevitethők az említett kódok bármelyikével, valamint a beadás történhet egyszeri vagy osztott dózisban.

A találmányban tárgyalt vegyületek orális bevitelét különböző módon megformált készítmények alakjában végezhetjük, vagyis a különböző gyógyászati szempontból alkalmazható közömbös hordozóanyagokkal készíthetünk tablettát, kapszulát, pasztillát, cukorkát, port, permetet, vizes szuszpenziót, elixirt, szirupot, stb. A kísérőanyag lehet szilárd hígító vagy töltőanyag, steril vizes közeg, különféle nem-toxikus szerves oldószer, stb. Ezenkívül a gyógyszerkészítményeket édesíthetjük vagy ízesíthetjük az ilyen célra általánosan használt anyagokkal. Az orális készítmények általában 0,5-90 súlyszázalék hatóanyagot tartalmaznak, a dóziségségnek megfelelő mennyiségben.

A szájon át történő adagolásra szánt tabletták vivőanyagokat – például nátrium-citrát, kalcium-karbonát és kalcium-foszfát –, szétesést elősegítő anyagokat – például keményítő (előnyösen burgonya vagy tapióka keményítő), alginát és bizonyos szilikátok – és kötőanyagokat – például polivinil-pirrolidon, szukroz, zselatin és akácia mézga – tartalmazhatnak. Ezenkívül gyakran adnak síkosító anyagokat – például magnézium-sztearát, nátrium-lauril-szulfát és talkum – is a tablettákhoz. Hasonló típusú szilárd készítményt alkalmazhatunk a kemény és lágy-töltetű zselatin kapszulák töltetként is, ilyen esetben előnyös anyag lehet még a laktóz vagy tejcukor és a nagy molekulásúlyú polietilén-glikolok. Ha vizes szuszpenziót és/vagy elixirt akarunk alkalmazni szájon keresztül történő adagoláshoz, különféle édesítő és ízesítő anyagokat, színező anyagokat vagy festékeket és – ha szükséges – emulgeáló és/vagy szuszpendáló szereket, valamint hígító közegként vizet, etanolt, propilén-glikolt, glicerint vagy ezek különféle elegyét adhatjuk a készítményhez.

Az alábbi példák kizárólag szemléltető jellegűek, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

A BOK rövidítés jelentése: t-butil-oxi-karbonil*. Ahol külön nem adjuk meg, az aminosavak természetes, L-formája szerepel.

1. példa

60 Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-Lys-

-Phe peptidszármazékot az alábbi reakciólépéseken keresztül állítjuk elő:

A) Az (N- α -t-butil-oxi-karbonil/-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter előállításához 50 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 162 mg (1,2 mmól) N-metil-morfolint, 428 mg (1 mmól) L-fenilalanin-benzilészter-p-toluolszulfonátot, 456 mg (1,2 mmól) N- α -(t-butil-oxi-karbonil)-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-L-lizint és 635 mg (80%-os tisztaságú, 1,2 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot. A kapott oldatot 19 órán keresztül 20°C hőmérsékleten kevertetjük. A reakcióelegyet ezután egymást követően 75 ml 5,5%-os vizes sósavval, 75 ml telített, vizes NaHCO₃ oldattal és 75 ml sóoldattal mossuk, majd vízmentes MgSO₄ felett szárítjuk. Szűrés és bepárlás után 669 mg nyersterméket kapunk hab formájában. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK). Ezt az anyagot további tisztítás nélkül közvetlenül felhasználjuk a következő reakciólépésnél.

B) Az (N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid előállításához az előző lépésnél nyert (N- α -t-butil-oxi-karbonil/-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészterből 650 mg-t (1 mmól) feloldunk 7 ml 3,7 N sósavas dioxánban, és egy órán keresztül hagyjuk állni 20°C hőmérsékleten. Az oldatot bepároljuk, 583 mg nyers terméket kapva olaj formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

C) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin/-fenilalanin-benzilészter előállításához 50 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 583 mg (1 mmól), a B) lépésnél nyert (N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-hidrokloridot, 330 mg (1,2 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-sztatint, 162 mg (1,2 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 635 mg (80%-os tisztaságú, 1,2 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot. Az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet az A) reakciólépésnél leírtak szerint dolgozzuk fel, 760 mg nyersterméket kapva, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő lépésnél.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

D) A sztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid előállításához 10 ml 3,7 N sósavas dioxánban feloldunk 760 mg (1 mmól), a C) lépésnél nyert (N/-t-butil-oxi-karbonil/-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilésztert, és egy órán keresztül hagyjuk állni 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet a B) lépésben leírtak szerint feldolgozzuk, 620 mg nyersterméket nyerve hab formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

E) Az (N- α -t-butil-oxi-karbonil/-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-sztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter előállításához 50 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 600 mg (0,857 mmól),

a D) reakciólépésnél nyert sztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-hidrokloridot, 86,7 mg (0,957 mmól) N-metil-morfolint, 365 mg (1,03 mmól) N- α -(t-butil-oxi-karbonil)-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-L-hisztidint, 135 mg (1,03 mmól) N-hidroxi-benzo-triazolt és 545 mg (1,03 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot, és 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet az A) reakciólépésnél leírtak szerint feldolgozzuk, hab formájában 770 mg nyersterméket nyerve, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 2H, BOK), 1,6 (s, 9H, BOK).

F) A hisztidin-sztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-dihidroklorid előállításához 770 mg (0,95 mmól) az E) reakciólépésben előállított (N- α -t-butil-oxi-karbonil/-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-sztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilésztert feloldunk 10 ml 3,7 N sósavas dioxánban, és 1,5 órán keresztül hagyjuk állni, 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet a B) reakciólépésnél leírtak szerint feldolgozva, 602 mg nyersterméket nyerünk hab formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakcióban.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

G) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin/-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin/-fenilalanin-benzilészter előállításához 50 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 602 mg (0,689 mmól), az F) lépésnél nyert hisztidin-sztatin-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzil-észter-dihidrokloridot, 139 mg (1,38 mmól) N-metil-morfolint, 219 mg (0,827 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-fenilalanint, 112 mg (0,827 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 438 mg (0,827 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot. Az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet az A) reakciólépésnél leírtak szerint feldolgozva, 555 mg habos anyagot kapunk, kromatográfiával tovább tisztítunk. Szilikagélen CH₂Cl₂/MeOH, 95 : 5 eluenssel kromatografálva, 136 mg tisztított terméket nyerünk hab alakjában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

H) A kívánt (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-lizin-fenilalanin végtérmekekhez úgy jutunk, hogy 136 mg (0,17 mmól) (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin/-N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzil-észtert és 70 mg 20%-os Pd(OH₂)/C katalizátort adunk az adott sorrendben 15 ml metanolhoz, és a kapott keveréket 4 órán keresztül hidrogénezzük 3,5 bar nyomású hidrogén alatt, 20°C hőmérsékleten. A reakciókeveréket ezután Super-Celen leszűrjük, és a szűrletet szárazra pároljuk. 76 mg üveges anyagot kapva, amit éterben eldörzsölve, 63 mg tisztított (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-lizin-fenilalanint nyerünk por formájában.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

2. példa

Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-Ile-Sta-nátriumsót az alábbi reakciólépéseken keresztül készítjük el:

A) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin)-sztatin-etilészter előállításához 100 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 717 mg (3 mmól) sztatin-etilészter-hidrokloridot, 304 mg (3 mmól) N-metil-morfolint, 865 mg (3,6 mmól) N/-t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucin 1/2 H₂O-t, 486 mg (3,6 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 1,91 g (80%-os tisztaságú, 3,6 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot. Az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet ezután 75 ml 5,5%-os vizes sósavval, 75 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal és végül 75 ml sóoldattal mossuk, és vízmentes MgSO₄ felett szárítjuk. Szűrés és bepárlás után 1,39 g nyersteget kapunk habos anyag formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakcióban.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

B-G) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-sztatin-etilésztert az 1. példa B-G pontjaiban leírtak szerint állítjuk elő, 1,37 g az A) reakciólépésnél nyert (N/-t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin)-sztatin-etilészterből kiindulva. 128 mg kívánt terméket kapunk, hab formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

A G) lépés kromatográfiás tisztításával kloroform/etanol 95 : 5 oldószerelegyet használunk.

H) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-Ile-Sta-nátriumsójának előállításához 120 mg (0,14 mmól), a G) lépésnél nyert (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-sztatin-etilésztert oldunk 2 ml dimetoxi-etánban, és az oldathoz 0,17 ml 1 N vizes NaOH oldatot adunk, 2 és fél óráig, 20°C hőmérsékleten történő kevertetést követően újabb 0,17 ml 1 N vizes NaOH oldatot adunk hozzá. További 2 óráig keverés után a reakciókeverékből forgó bepárlóban eltávolítjuk a dimetoxi-etánt, 5 ml vízzel hígítunk, és a kémhatás pH=7,8-ra való beállítása után az oldatot fagyaszttva szárítjuk. A kapott maradékot éterben szuszpendáljuk. A felülúszót szárazra párolva, 88 mg habos anyagot kapunk, amit kis térfogat éterben eldörzsölve 64 mg tisztított (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-sztatin-nátriumsót nyerünk sárgás por formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

3. példa

Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-Ile-(amino/-n-vajsav/) előállítását a következő reakciólépéseken keresztül valósítjuk meg.

A) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin)-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter előállításához 60 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 2,4 g (10 mmól) N/-t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucint, 1,0 g (10 mmól) N-metil-morfolint, 1,93 g (10 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 4,23 g (80%-os tisztaságú, 10 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot, és az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet szárazra pá-

roljuk, és a bepárlási maradékot etil-acetátban oldjuk. Az oldatot kétszer 50 ml 5%-os vizes sósavval, kétszer 50 ml 1 N vizes NaOH oldattal, egyszer vízzel és egyszer sóoldattal mossuk, vízmentes Mg-SO₄ felett szárítjuk, szűrjük és forgó bepárlóban bepároljuk, 2,87 g nyersteget kapva hab formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

B) Az izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter-hidroklorid előállításához 2,87 g (7,1 mmól) N/-t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin)-(amino/-n-vajsav/)-benzilésztert, amit az A) reakciólépésnél nyertünk, feloldjuk 10 ml 3,7 N sósavos dioxánban, és az oldatot egy órán keresztül hagyjuk állni 20°C hőmérsékleten. Ezután az oldatot szárazra pároljuk, és a bepárlási maradék éteres eldörzsölése után 2,4 g nyersteget kapunk fehér, szilárd anyag formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,2 (s, 6H, benzil CH₂)

C) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter előállításához 20 ml 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 275,35 mg (1 mmól) N/-t-butil-oxi-karbonil/-sztatint, 101 mg (1,0 mmól) N-metil-morfolint, 342 mg (1 mmól) a B) reakciólépésnél nyert izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter-hidrokloridot, 135 mg (1,0 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 206 mg (1,0 mmól) diciklohexil-karbodiimidet, és az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. Az oldatot szűrve és bepárolva, a kapott maradékot etil-acetátban szuszpendáljuk. A keveréket szűrjük, és a szűrletet szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot szililagén kromatografáljuk, kloroform/-etil-acetát eluenst használva. 464 mg tisztított terméket nyerünk.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

D) A sztatin-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter-hidrokloridot a B) reakciólépésnél leírtakhoz hasonlóan nyerjük. 464 mg (0,82 mmól), a C) lépésnél nyert (N/-t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter védőcsoportjának eltávolításával. 416 mg nyersteget kapunk fehér szilárd anyag formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő lépésnél.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂):

E) Az (N-α/-t-butil-oxi-karbonil/-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-sztatin-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter előállítását a C) reakciónál leírtakhoz hasonlóan végezzük, 416 mg (0,83 mmól), a D. reakciólépésnél kapott sztatin-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter-hidrokloridot 295 mg (0,82 mmól) N-α/-t-butil-oxi-karbonil/-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-L-hisztidinnel összekapcsolva. 391 mg tisztított terméket kapunk.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK) és 1,6 (s, 9H, BOK).

F) A hisztidin-sztatin-izoleucin-(amino/-n-vajsav/)-benzilészter-dihidrokloridot a B) reakciónál leírtak szerint állítjuk elő, 391 mg (0,49 mmól), az E) reakciólépésnél kapott (N-q/-t-butil-oxi-karbonil/-

-N-im-/t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-sztatin-izoleucin-(amino-/n-vajsav/-)benzilészter védőcsoportjainak eltávolításával. 328 mg nyerstermékét kapunk fehér szilárd anyag formájában, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő lépésnél.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

G) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenil-alanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-(amino-/n-vajsav/-)benzilészter előállításához 20 ml °C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 329 mg (0,487 mmól), az F) lépésnél nyert hisztidin-sztatin-izoleucin-/amino-n-vaj-benzilésztert, 0,128 ml (1,17 mmól) N-metil-morfolint, 155 mg (0,585 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-fenil-alanint, 79 mg (0,585 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt és 121 mg (0,585 mmól) diklohexil-karbodiimidet. Az oldatot 19 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet a C) lépésnél leírtak szerint dolgozzuk fel és kromatográfiásan 324 mg tisztított terméket nyerve.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

H) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-(amino-/n-vajsav/-) végtermék előállításához 5 ml metanolban oldott, 324 mg (0,38 mmól), a G) reakciólépésnél kapott (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenil-alanin)-hisztidin-sztatin-izoleucin-(amino-/n-vajsav/-)benzilésztert hidrogénezünk szobahőmérsékleten, 3,5 bar nyomású hidrogéngáz alatt, 20%-os Pd(OH)₂/C katalizátor jelenlétében. A reakciókeverékből szűrővel eltávolítjuk a katalizátort, és a szűrletet szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot éterben eldörzsölve, 190 mg tiszta kívánt végtermékét kapunk fehér por formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

4. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-(amino-/4-szek-butil-vajsav/-) előállítását az alábbi reakciólépéseken keresztül hajtjuk végre.

A) Az N-/t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin-nal előállításához 10,0 g (40,7 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-izoleucin-metilésztert oldunk 100 ml toluolban. Az oldatot -75°C hőmérsékletűre hűtjük, és 102 ml 1 N diizobutil-alumínium-hidrid toluolos oldatot adunk cseppenként hozzá úgy, hogy a reakciókeverék hőmérséklete -65°C alatt legyen. Miután valamennyi hidridet hozzáadtuk, a reakciókeveréket 10 percen keresztül kevertetjük -75°C hőmérsékleten, majd 10 ml metanol lassú hozzáadásával a hidridet elbontjuk, a hőmérsékletet -65°C alatt tartva. A reakcióoldatot kálium-nátrium-tartarát hideg vizes telített oldatának 200 ml-éhez öntjük. A keverékre étert rétegezünk, és egy órán keresztül kevertetjük, majd a szerves fázist elválasztjuk, sóoldattal mossuk, vízmentes Na₂SO₄ felett szárítjuk, szűrjük és bepároljuk. 7,0 g nyerstermékét kapunk, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésben.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

B) Az etil-L-(4-amino-4-szek-butil-vajsav)-hidroklorid előállításához 1 g (4,6 mmól), az A) lépésnél kapott N-/t-butil-oxi-karbonil/-izoleucin-nal és 1,93 g (5,56 mmól) karbetoxi-metilén-trifenil-foszfóránt feloldunk 50 ml kloroformban és az oldatot hagyjuk 48 órán

keresztül állni 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet szárazra pároljuk, és szilikagélén kloroformmal kromatografálva tisztítjuk. 1 g tisztított etil-L-(4-/t-butil-oxi-karbonil-amino-/4-szek-butil-delta-2-butirát)-ot nyerünk olajos anyag formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 4,2 (s, 2H, etil CH₂).

300 mg (1,05 mmól) etil-L-(4-/t-butil-oxi-karbonil-amino-/4-szek-butil-delta-2-butirát)-ot hidrogénezünk metanolban két órán keresztül 3,5 bar nyomású hidrogéngáz alatt 20%-os Pd(OH)₂/C katalizátor jelenlétében. A katalizátort szűrővel eltávolítjuk a reakciókeverékből, és a szűrletet forgó bepárlóban bepároljuk 300 mg nyers etil-L-(4-/t-butil-oxi-karbonil-amino-/4-szek-butil-butirát)-ot kapva olaj formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 4,2 (s, 2H, etil CH₂).

300 mg etil-L-(4-/t-butil-oxi-karbonil-amino-/4-szek-butil-butirát)-ot 4 ml 3,7 N sósavas dioxánban oldunk, és az oldatot szűrővel egy órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet szárazra pároljuk, 231 mg habos nyerstermékét nyerve, amit további tisztítás nélkül használunk fel a következő reakciólépésnél.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 4,2 (s, 2H, etil CH₂).

C) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etilészter előállításához 15 ml °C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 286 mg (1,04 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatint, 232 mg (1,04 mmól), a B) lépésnél nyert etil-L-/4-amino-4-szek-butil-butirát/-hidrokloridot, 141 mg (1,04 mmól) N-hidroxi-benzotriazolt 105 mg (1,04 mmól) N-metil-morfolint és 215 mg (1,04 mmól) diklohexil-karbodiimidet. Az oldatot 19 órán keresztül 20°C hőmérsékleten kevertetjük. A reakciókeveréket leszűrjük, és a szűrletet szárazra pároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélén kromatografáljuk, kloroform/etil-acetát eleggyel eluálva, így 400 mg tisztított termékhez jutunk.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

D-G) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etilésztert a 3. példa D-G) lépésénél leírtak szerint állítjuk elő, 400 mg (0,94 mmól), a C) reakciólépésnél nyert (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etilésztert a 3. példa D-G) lépésénél leírtak szerint állítjuk elő, 400 mg (0,94 mmól), a C) reakciólépésnél nyert (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etil-észtert 211 mg tisztított (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etilészterre alakítva.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

H) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-kivánt végtermék előállításához 200 mg (0,274 mmól), a G) reakciólépésnél nyert (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/4-szek-butil-vajsav)-etilésztert 5 ml dimetoxi-etánban oldunk, és 0,3 ml 1 N vizes NaOH oldatot adunk hozzá. A reakciókeveréket 3 órán keresztül kevertetjük 20°C hőmérsékleten. Majd további, 0,3 ml 1 N vizes NaOH oldatot adunk hozzá, és a kevertetést egy órán keresztül folytatjuk

20°C hőmérsékleten. A reakciókeverékből forgó bepárlóban eltávolítjuk a dimetoxi-etánt, etil-acetátot adunk hozzá, és a kémhatást 5%-os vizes sósavval pH = 2 értékre állítjuk be. A szerves fázist elválasztjuk, sóoldattal mossuk, szűrjük, vízmentes Mg-SO₄ felett szárítjuk és bepárolva fehér szilárd anyagot kapunk, amit éterben eldörzsölve 35 mg tisztított kívánt végtermékhez jutunk.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

5. példa

Az (N-(t-butil-oxi-karbonil)-Phe)-His-aminoszintatin-Phe-diacetát előállítását a következő reakciólépéseken keresztül valósítjuk meg.

A) Az etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3(S)-azido-6-metil-heptanoát és az etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-6-metil-transz-2-heptanoát előállításánál 7,6 g (25,05 mmól) 3-epi-N-(t-butil-oxi-karbonil)-szintatin és 2,78 g (27,55 mmól) trietil-amin 200 ml metilén-kloridban készült oldatához 0°C hőmérsékleten 3,15 g (27,55 mmól) metán-szulfonil-kloridot adunk cseppenként. A reakciókeveréket egy órán keresztül kevertetjük 0°C hőmérsékleten, hagyjuk, hogy egy óra alatt szobahőmérsékletre melegedjenek, majd kétszer 200 ml 1 N vizes sósavval és 200 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal mossuk. A szerves fázist MgSO₄ felett szárítjuk és bepárolva 9,75 g sárga olajat nyerünk. Az olaj 150 ml N,N-dimetil-formamidban készült oldatához 2,45 g (37,7 mmól) nátrium-azidot adunk és a reakciókeveréket négy órán át melegítjük 60°C hőmérsékleten. Az oldószert erős vákuumban eltávolítjuk, a maradékot 500 ml vízben oldjuk, és kétszer 150 ml éterrel extraháljuk. Az egyesített éteres extraktumot 100 ml sóoldattal mossuk, MgSO₄ felett szárítjuk és bepároljuk, 6,6 g halványsárga olajat nyerve. Az olajat gyors-kromatográfiával szétválasztva, eluensként 25–30% étert tartalmazó hexánt használva, egyrészt 334 mg etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3(S)-azido-6-metil-heptanoátot kapunk olaj formájában (4% kinyerés) R_f = 0,62 (éter/hexán 1 : 1),

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,95 (d, J = 6,6H), 1,30 (t, J = 7, 3H), 1,47 (s, 9H), 2,58 (d, J = 7, 2H), 4,17 (q, J = 7, 2H), 4,53 (széles d, 1H),

¹³C-NMR (CDCl₃): 1,42, 22,2, 23,0, 24,9, 28,4, 37,2, 42,4, 51,6, 61,1, 62,8, 155,8, 171,0

IR (CHCl₃): 3473, 2102 cm⁻¹.

A polárosabb frakciókból 4,9 g átlátszó olajat nyerünk (R_f = 0,55, éter/hexán 1 : 1), ami állás közben kikristályosodik. Jéghideg hexánban eldörzsölve 3,78 g etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-6-metil-transz-2-heptanoáthoz jutunk pelyhes, fehér anyag formájában (53%-os kinyerés).
Op.: 56–58°C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,93 (d, J = 6,6H), 1,30 (t, J = 7, 3H), 1,47 (s, 9H), 4,18 (q, J = 7, 2H), 5,9 (dd, J = 15,1, 1H), 6,83 (dd, J = 15,5, 1H).

IR (KBr): 3350, 3307, 1720, 1701, 1684, 1659 cm⁻¹.

B/1) Az etil-3-benzil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4(S,S)-6-metil-heptanoát előállításához a 3,52 g (12,35 mmól) etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-6-metil-transz-2-heptanoátból, 3,97 g (37,0 mmól) benzil-aminból és 90 ml abszolút etanolból

álló reakciókeveréket 58°C hőmérsékleten melegítjük 7 napon keresztül, majd bepároljuk és gyors-kromatográfiával szétválasztjuk, eluensként 10–15% etil-acetátot tartalmazó hexánt használva. A kevésbé poláris frakciókból 963 mg olajos terméket nyerünk (20%-os kinyerés).

R_f = 0,32 (25% etil-acetát hexánban).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,97 (d, J = 5, 6H), 1,25 (t, 3H, J = 7), 1,45 (s, 9H), 2,43 (m, 2H), 3,32 (m, 1H), 3,77 (s, 2H), 4,10 (q, 2H, J = 7), 4,65 (d, 1H, J = 9), 7,22 (s, 5H).

IR (CHCl₃): 3433, 1720 (váll), 1709 cm⁻¹.

Tömegspektrum: m/e 393 (M⁺ + 1), 319, 206 (alapsúcs), 91.

B/2) Az etil-3-benzil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4(S,S)-6-metil-heptanoát másik módon történő előállításához 120 mg (0,36 mmól) etil-4(S)-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3(S)-azido-6-metil-heptanoát 5 ml ecetsav/etanol 1 : 1 arányú elegyében készült oldatához 20 mg 10%-os Pd/C katalizátort adunk és 1 atm. nyomású hidrogéngáz alatt hidrogénezünk szobahőmérsékleten, három órán keresztül. Miután szűrővel eltávolítottuk a katalizátort, a reakciókeveréket csökkentett nyomáson etanolos azeotropként elpárologva olajos maradékot kapunk. Ezt a 136 mg olajat 3 ml metanolban oldjuk, majd egymást követően szobahőmérsékleten 37 mikrolitert (38,2 mg, 0,36 mmól) benzaldehidet és 0°C hőmérsékleten 34 mg (54 mmól) NaCNBH₃-t adunk hozzá. A reakciókeveréket fél órán keresztül kevertetjük 0°C hőmérsékleten, majd mielőtt vízzel és telített vizes NaHCO₃ oldattal hígítanánk, hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. Olajos csapadék keletkezik, amit metilén-kloriddal extrahálunk. A szerves fázist MgSO₄-tal szárítjuk, olajos maradékig bepárolva. Az olajos maradék vékonyrétegekromatogramján csak egyetlen epimer az etil-3-benzil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4-(S,S)-6-metil-heptanoát látható. Az említett olajat gyors-kromatografálással tisztítjuk, 10–15% etil-acetátot tartalmazó hexánt használva eluensként. 68 mg terméket kapunk, ami a vékonyrétegekromatográfás vizsgálatok és az NMR alapján azonos a B/1) lépésnél nyert anyaggal.

C) A 3-benzil-oxi-karbonil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4(S,S)-6-metil-heptánsav előállításához 530 mg (1,35 mmól), a B/1) lépésnél nyert etil-3-benzil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4-(S,D)-6-metil-heptanoátot feloldunk 12 ml ecetsav/etanol 1 : 1 elegyben, és 60 mg 10%-os Pd/C katalizátort adunk hozzá. 3,5 bar nyomású hidrogéngáz alatt hidrogénezünk szobahőmérsékleten 3 órán keresztül. A katalizátort szűrővel eltávolítjuk, és a szűrletet olajos maradékig pároljuk, amit 10 ml dioxán és 10 ml víz-elegyében veszünk fel. Szilárd NaHCO₃-t (pH = 7,8), majd 289 mikrolitert (345 mg, 2,025 mmól) benzil-oxi-karbonil-kloridot (Chemalog) adunk hozzá. A reakciókeveréket másfél órán keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten a hatást pH = 8 értéken tartva szilárd NaHCO₃ hozzáadásával. A kevertetést további 4 órán keresztül folytatjuk pH = 12,4 kénhatásnál, amit 4 ml vizes 1 N NaOH oldat hozzáadásával érünk el, ha csapadék-kiválás történik, a csapadékot vizes dioxán adagolásával visszük oldatba. A reakciókeveréket 1 N vizes

sósavoldattal semlegesítjük 0°C hőmérsékleten és csökkentett nyomáson eltávolítjuk a dioxánt. A maradékot 50 ml vízzel hígítjuk, és 2x50 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az egyesített etil-acetátos extraktumot magnézium-szulfáttal szárítjuk és bepároljuk, 588 mg olajos maradékot nyerve, amit gyors-kromatográfiával tisztítunk, az eluens 3% metanolt tartalmazó kloroform. Így 288 mg olajos termékhez jutunk (41%-os kinyerés).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): δ 0,81 (d, J = 7, 3H), 0,86 (d, J = 7, 3H), 1,38 (s, 9H), 2,2–2,4 (m, 2H), 5,02 (AB spinrendszer középpontja: J = 13, 2H), 6,48 (d, J = 9, 1H), 7,05 (d, J = 9, 1H), 7,3 (s, H).

Tömegspektrum: m/e 186, 130, 86 (alapcsúcs).

D) Az izoleucin-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid előállításához 14,05 (58,5 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-izoleucin-hemihidráttal (Chemalog) oldunk 500 ml metilén-kloridban és MgSO₄-tal szárítjuk az oldatot. Szűrés után 6,43 ml (5,92 g, 58,5 mmól) N-metil-morfolint adunk hozzá. A reakciókeveréket –16°C hőmérsékletre hűtjük és 7,59 ml (7,99 g, 58,5 mmól) klór-hangyasav-izobutilésztert adunk hozzá olyan sebességgel, hogy az exoterm reakció a rendszert ne melegítse –10°C hőmérséklet fölé. A reagens hozzáadása után 10 percen keresztül kevertetjük az oldatot, majd 24,8 (58,0 mmól) L-fenilalanin-benzilészter-p-toluolszulfonátot és 6,43 ml (5,92 g, 58,5 mmól) N-metil-morfolint adunk 50 ml metilén-kloridban cseppenként hozzá, olyan sebességgel, hogy az exoterm reakció ne melegítse a reakciókeveréket –10°C hőmérséklet fölé. Amikor a hozzáadás teljes, hagyjuk a reakciókeveréket egy óra alatt szobahőmérsékletre emelkedni, majd 2x300 ml 5%-os vizes sósavoldattal és 2x300 ml 10%-os vizes K₂CO₃ oldattal mossuk. A szerves fázist magnézium-szulfáttal szárítjuk és bepároljuk, 27,40 g fehér szilárd anyagot nyerve. Ezt hexánban eldörzsölve, 24,97 g tisztított (N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-izoleucin)-L-fenilalanin-benzilésztert kapunk (42%-os kinyerés).

Op.: 131–132°C.

R_f = 0,43 (etil-acetát/éter 1 : 1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,78–0,9 (széles, d, 6H), 1,43 (s, 9H), 3,08 (d, J = 6), 3,87 (dd, J = 5,9 1H), 4,75–5,1 (m, H), 5,06 (s, 2H), 6,3 (d, J = 9,1 H), 7,0–7,3 (m, 1H).

12,50 g (25,7 mmól) (N-(t-butil-oxi-karbonil)-L-izoleucin)-L-fenilalanin-benzilészter 125 ml 4 N sósavas dioxánban készült oldatát 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük, a levegő nedvességétől kalciumkloridos csővel védve. Az oldószert csökkentett nyomáson elpárologtatjuk, és a maradékot éterben eldörzsöljük, 11,16 g terméket nyerve fehér szilárd anyag formájában.

Op.: 178–179,5°C (bomlik).

R_f = 0,73 (butanol/víz/ecetsav, 4 : 1 : 1).

¹H-NMR (CD₃OD): δ 0,9–1,1 (m, 6H), 3,1–3,0 (m, 2H), 3,73 (d, J = 5, 1H), 5,08 (s, 1H), 7,18 (s, 5H), 7,24 (s, 5H).

E) Az (N-gamma-t-butil-oxi-karbonil)-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatin)-izoleucin-fenilalanin-benzilészter előállításához 412 mg (1,02 mmól) izoleucin-fenilalanin-benzilészter 10 ml metilén-kloridban ké-

szült oldatát 0°C hőmérsékleten 142 mikroliter (103 mg, 1,02 mmól) trietil-ammal semlegesítjük. 416 mg (1,02 mmól) 3-benzil-oxi-karbonil-amino-4-(t-butil-oxi-karbonil-amino)-3,4(S,S)-6-metil-heptán-savat és 205 mg, (1,52 mmól) N-hidroxi-benzotriazol adunk az oldathoz 0°C hőmérsékleten. Végezetül 210 mg (1,02 mmól) diciklohexil-karbodiimid 5 ml metilén-kloridban készített oldatát adjuk 0°C-on, hozzá. A reakciókeveréket 3 órán keresztül 0°C hőmérsékleten kevertetjük, majd szobahőmérsékletre melegítve további 16 órán keresztül. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk, és a maradékot 75 ml etil-acetátban kevertetjük. A kapott keverékből a szilárd anyagot szűrővel eltávolítjuk, a szűrletet 75 ml 10%-os vizes citromsavoldattal, 75 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal mossuk, MgSO₄-tal szárítjuk és bepároljuk, 217 mg szilárd maradékot kapva. Ezt egyesítjük a szűrésnél kiszűrt szilárd anyaggal (l. előbb). A termék és a ciklohexil-urea keverékből álló, 1,043 g súlyú egyesített szilárd anyagot további tisztítás nélkül használjuk fel a következő reakciólépésnél.

F) A benzil-oxi-karbonil-amino-sztatin-izoleucin-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid előállításához az E) lépésnél nyert 1,043 g nyers (N-gamma-t-butil-oxi-karbonil)-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatin)-izoleucin-fenilalanin-benzilészter 25 ml 4 N sósavas dioxánban készült oldatát egy órán keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten, miközben a levegő nedvességét CaCl₂-os csővel zárjuk ki. Csökkentett nyomáson eltávolítva az oldószert – metilén-klorid és éter azeotropjaként –, és a maradékot éterben eldörzsölve, 963 mg szilárd nyersterméket kapunk, ami a kívánt termék és diciklohexil-urea keveréke. A kapott nyersterméket további tisztítás nélkül használjuk fel a következő lépésnél.

G) Az (N-a-t-butil-oxi-karbonil)-N-im-/t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatin)-izoleucin-fenilalanin-benzilészter előállításához az F) reakciólépésnél nyert 963 mg nyers benzil-oxi-karbonil-amino-sztatin-izoleucin-fenilalanin-benzilészter-hidrokloridot 20 ml metilén-kloridban szuszpendáljuk, és 0°C hőmérsékleten semlegesítjük 177 mikroliter (128 mg, 1,02 mmól) trietil-ammal. A szuszpenzióhoz 542 mg (1,53 mmól) N-a-t-butil-oxi-karbonil/-N-im-/t-butil-oxi-karbonil/-L-hisztidint és 206 mg (1,53 mmól) N-hidroxi-benzotriazol adunk 0°C hőmérsékleten. Végezetül 1 ml metilén-kloridban 315 mg (1,53 mmól) diciklohexil-karbodiimidet adunk 0°C hőmérsékleten hozzá. A reakciókeveréket 3 órán keresztül kevertetjük 0°C hőmérsékleten, majd további 16 órán át szobahőmérsékleten. Csökkentett nyomáson eltávolítjuk az oldószert körülbelül a felét, és a maradékot 125 ml etil-acetátba keverjük. A nyert keveréket leszűrjük, eltávolítva ezzel a szilárd anyagot, és a szűrletet 2x100 ml 10%-os vizes citromsavoldattal és 100 ml vizes telített NaHCO₃ oldattal mossuk, MgSO₄-tal szárítjuk és bepároljuk, 910 mg szilárd anyagot nyerve. Ezt az anyagot gyors-kromatográfiával tisztítjuk – az eluens, 0,5–0,75% metanolt tartalmazó kloroform – és így 221 mg tisztított termékhez jutunk szilárd anyag formájában. Az etil-acetátos keverékből szilárd anyag (l. előbb) a diciklohexil-urea mellett jelentős mennyiségű kívánt terméket tartalmaz. A kiszűrt szilárd anyagot 100 ml metilén-kloridban

erélyes keverés közben eldörzsölve, és leszűrve, a diciklohexil-urea legnagyobb részét elválasztjuk. A szűrlet bepárlásával nyert 1,1 g anyagot a fentiekkel azonos módon kromatografálva, további 401 mg termékhez jutunk. A tisztított termékeket egyesítve, éterben eldörzsöljük, és így 592 mg kívánt termékhez jutunk pelyhes, fehér szilárd anyag formájában (58%-os kinyerés).

Op.: 229–231°C.

R_f = 0,22 (2,5% metanol kloroformban).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0,6–0,85 (m, 12H), 1,42 (s, 9H), 1,58 (s, 9H), 2,42 (ABX spinrendszer AB középpontja: 2H, J_{AB} = 14, J_{AX} = 5, J_{BX} = 10), 2,94 (d, J = 5, 2H), 3,13 (d, J = 6, 2H), 3,55–3,7 (m, 1H), 4,1–4,3 (m, 3H), 4,98 (q, J = 7, 1H), 5,2–5,5 (m, 4H), 6,10 (d, J = 7, 1H), 6,37 (széles d, 1H), 6,80 (d, J = 8, 1H), 7,0–7,4 (m, 17H), 7,5 (széles, 1H), 8,00 (s, 1H).

H) A hisztidin-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid előállításához 204 mg (N-a/-t-butil-oxi-karbonil/-N-im/-t-butil-oxi-karbonil/-hisztidin)-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-benzilészter 7 ml 4 N sósavas dioxánban készült oldatát 5 órán keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten, a levegő nedvességét CaCl₂-os csővel kizárva. Az oldószert csökkentett nyomáson, metilénklorid és éter azeotropjaként eltávolítva, 853 mg terméket nyerünk fehér por formájában (86%-os kinyerés).

Op.: 154–157°C.

R_f = 0,55 (butilalkohol/víz/ecetsav : 4 : 1 : 1).

¹H-NMR (CD₃PD): δ 1,05–1,1 (m, 12H), 2,3–2,5 (m, 2H), 3,1(d, J = 8, 2H), 5,08 (s, 4H), 7,18 (s, 5H), 7,30 (s, 10H), 7,53 (s, 11H), 8,83 (s, 11H).

I) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-benzilészter előállításához 306 mg (0,352 mmól) hisztidin-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid 5 ml dimetil-formamidban készült oldatát 0°C hőmérsékleten 123 mikroliter (88 mg, 0,879 mmól) trietil-aminnal semlegesítjük. 0°C hőmérsékleten 103 mg (0,387 mmól) N/-t-butil-oxi-karbonil/-L-fenilalanint, 79 mg (0,580 mmól) N-hidroxi-benzotriazol és végül 980 mg (0,387 mmól) diciklohexil-karbodiimid 1,5 ml dimetil-formamidban készült oldatát adjuk az oldathoz. A reakciókeveréket 3 órán keresztül 0°C hőmérsékleten, majd további 16 órán át szobahőmérsékleten kevertetjük. Az oldószert erős vákuumban eltávolítjuk, a maradékot 50 ml etil-acetátban kevertetjük és a kapott keveréket leszűrve, a szilárd anyagot eltávolítjuk. A szűrletből elpároljuk az oldószert, a maradékot 50 ml metilén-kloridban kevertetjük, és a keverékből további szilárd anyagot szűrünk ki. A második szűrés szűrletét betöményítjük, a maradékot 50 ml etil-acetátban oldjuk, az oldatot 2x40 ml 10%-os vizes citromsav oldattal és 2x40 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal mossuk. A szerves fázist magnézium-szulfát felett szárítjuk és bepároljuk, 153 mg szilárd anyagot nyerve. Ezt, valamint az etil-acetátos és metilén-kloridos kevertetésnél kiszűrt szilárd anyagokat egyesítjük, és gyors-kromatográfálással tisztítjuk, eluensként 2-3%- metanolt tartalmazó kloroformot használva. 261 mg szilárd anyagot kapunk, amit éterben eldörzsölve 218 mg kívánt ter-

mékhez jutunk üveges szilárd anyag formájában (59%-os kinyerés).

Op.: 228–229°C.

R_f = 0,25 (5% metanol kloroformban).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ 0,6–0,8 (m, 16H), 1,26 (s, 9H), 2,38 (széles d, 2H), 1,8–3,0 (m, 2H), 3,15–3,4 (m, 4H), 4,1–4,0 (m, 1H), 4,1–4,2 (m, 1H), 4,2–4,4 (m, 2H), 4,6 (széles d, 1H), 4,9–5,2 (m, 6H), 5,9–6,1 (m, 1H), 6,78 (s, 1H), 7,2–7,4 (m, 22H), 7,49 (s, 1H).

J) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-diacetát kívánt végtérmelek előállításánál 24 mg (0,023 mmól) (N/-t-butil-oxi-karbonil)-fenilalanin)-hisztidin-benzil-oxi-karbonil-amino-sztatín-izoleucin-fenilalanin-benzil-észter 5 ml ecetsav/etanol, 1 : 1 arányú elegyében készült oldatához 12 mg 10%-os Pd/C katalizátort adunk, és a reakciókeveréket 2,9 bar nyomású hidrogéngáz alatt hidrogénezzük 3 órán keresztül szobahőmérsékleten. A katalizátort szűrővel eltávolítjuk, és a szűrletet bepároljuk. A bepárlási maradékot éterben eldörzsölve, 17 mg kívánt terméket kapunk fehér por formájában.

Op.: 155–159°C.

R_f = 0,58 (n-butanol/víz/ecetsav, 4 : 1 : 1).

¹H-NMR (CD₃CO₂D, 250 MHz): δ 0,7–1,0 (m, 12H), 1,33 (s, 9H), 2,7–2,9 (m, 2H), 3,0–3,6 (m, 6H), 3,6–3,9 (m, 16), 4,15–4,30 (m, 1H), 4,35–4,55 (m, 2H), 4,8–4,95 (m, 2H), 7,1–7,4 (m, 10H), 7,38 (s, 11H), 8,78 (s, 11H).

6. példa

Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-Sta-Ala-Sta-Glu-dibenzilészter előállítását az alábbi reakciólépéseken keresztül valósítjuk meg.

35 A) Az (N/-t-butil-oxi-karbonil/-alanin)-sztatín-glutaminsav-dibenzilészter előállításához 0°C hőmérsékleten 100 ml metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 324 mg (2,4 mmól) N-hidroxi-benzotriazol, 202 mg (2 mmól) N-metil-morfolint, 995 mg (2 mmól) L-glutaminsav-dibenzilészter-p-toluolszulfonátot, 660 mg (2,4 mmól) N-(t-butil-oxi-karbonil)-sztatint és 1271 mg (80% tisztaságú, 2,4 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonátot. Az oldatot 19 órán keresztül 20°C hőmérsékleten kevertetjük, majd egymást követően 5,5%-os vizes sósavval, telített vizes Na-HCO₃ oldattal és sóoldattal mossuk, MgSO₄ felett szárítjuk. Szűrés és bepárlás után 1269 g nyers (N/-t-butil-oxi-karbonil/-sztatín)-glutaminsav-dibenzil-észterhez jutunk olaj formájában.

50 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

A 1269 g olajat 10 ml 3,7 N sósavas dioxánban oldjuk, és az oldatot egy órán keresztül hagyjuk állni szobahőmérsékleten. Az erős vákuumban történő bepárlás maradékát éterben eldörzsöljük, és nitrogéngázban szárítjuk, 900 mg sztatín-glutaminsav-dibenzil-észter-hidrokloridot kapva hab formájában.

55 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

60 60 ml, 0°C hőmérsékletű metilén-kloridban az adott sorrendben feloldunk 186 mg (8,38 mmól) N-hidroxi-benzotriazol 116 mg (1,15 mmól) N-me-

til-morfolint, 600 mg (1,15 mmól), a fentiek szerint előállított sztatín-glutaminsav-dibenzilészter-hidrokloridot, 261 mg (1,38 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-L-alanint és 732 mg (80%-os tisztaságú, 1,38 mmól) 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid-metop-toluolszulfonátot. Az oldatot 19 órán keresztül 20°C-on kevertetjük, majd az adott sorrendben 5%-os vizes sósavval, telített vizes NaHCO₃ oldattal, és sóoldattal mossuk és MgSO₄-tal, szárítjuk. Szűrés és bepárlás után 743 mg nyersteget kapunk habos anyag formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

B-G) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-alanin-sztatín-glutaminsav-dibenzilészter kivánt végtermék előállítását az 1. példa B-G) reakciólépésénél leírtak alapján végezzük. 743 mg, az előző, A) lépésnél előállított (N-/t-butil-oxi-karbonil/-alanin)-sztatín-glutaminsav-dibenzilésztert átalakítva a kívánt terméké. 300 mg termékhez jutunk hab formájában.

¹H-NMR (CDCl₃): 5,2 (s, 2H, benzil CH₂).

Valamennyi lépésnél, ahol a védőcsoportot eltávolítjuk, a száraz bepárlási maradékot éterben dörzsöljük el. Az E) reakciólépés végénél a nyerstegetként kapott habot szilikagélén történő kromatográfiával tisztítjuk, eluensként kloroform/metanol, 95 : 5 oldószerelegyet használva. Tisztított terméként ugyancsak habot kapunk. A G) lépés végénél nem végzünk kromatográfiás tisztítást.

7. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-alanin-sztatín-glutaminsav előállítását a következő reakciólépésen keresztül végezzük

90 mg (0,077 mól) (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatín-alanin-sztatín-glutaminsav-dibenzilészterből, 45 mg 20%-os Pd(OH)₂/C katalizátorból és 10 ml metanolból álló reakciókeveréket 3,5 bar nyomású hidrogéngáz alatt hidrogénezük, szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. A katalizátort szűrővel eltávolítjuk a reakciókeverékből, és a szűrletet bepároljuk. 72 mg habos anyagot kapva. Ezt éterben eldörzsöljük és megszáritjuk, 51 mg tisztított kivánt termékhez jutva (72%-os kinyerés).

¹H-NMR (CDCl₃): 1,5 (s, 9H, BOK).

8. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-sta-(amino-/2-szek-butil-etilén/-)Phe ecetsavas sójának előállítását a következő reakciólépéseken keresztül végezzük.

A) Az N-/t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucinal előállításánál 24,3 g (0,134 mmól) L-izoleucin-metilészterből, 13,5 g (0,134 mmól) trietil-aminból és 210 ml metilén-kloridból álló reakciókeverékhez 29,1 g (0,134 mmól) di-terc-butil-dikarbonát (Aldrich) 25 ml metilén-kloridban készült oldatát adjuk cseppenként 0°C hőmérsékleten. A teljes hozzáadás után egy éjszakán keresztül hagyjuk a keverék hőmérsékletét szobahőre emelkedni, majd szűrjük. A szűrletet az adott sorrendben 3x75 ml 0,1 N sósavval, 100 ml vízzel és 75 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal mossuk, MgSO₄-tal szárítjuk és bepároljuk 30,7 g N-/t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucin-metilésztert nyerve olaj formájában (93%-os termelés).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,92 (d, J = 7, 6H), 1,43 (s, 9H), 3,70 (s, 3H), 4,17 (dd, J = 5 és 9, 1H), 5,03 (d, J = 9, 1H).

15,0 g (61,1 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucin-metilészter olaj 260 ml száraz toluolban készült oldatát -78°C hőmérsékletre hűtjük, és 153 ml 1 M diizobutil-alumínium-hidrid hexános oldatot adunk cseppenként hozzá olyan sebességgel, hogy az exoterm reakció ne melegítse a reakciókeveréket -65°C fölé. További 15 percig -78°C hőmérsékleten kevertetünk, majd a hidrid felesleget 15 ml metanol óvatos hozzáadásával - ügyelve, hogy a hőmérséklet ne emelkedjen -65°C fölé - elbontjuk, és 200 ml kálium-nátrium-tartarát oldatot adunk a reakciókeverékhez. Szobahőmérsékletre való melegedés után a szerves fázist elválasztjuk és 3x200 ml éterrel extraháljuk. Amennyiben szükséges az alumíniumsók oldásához további kálium-nátrium-tartarát oldatot adunk a keverékhez. Az egyesített szerves extraktumokat nátrium-szulfáttal szárítjuk és bepároljuk, olajos nyersteget kapva. A racemizálódás elkerülésére az olajat -78°C hőmérsékleten tároljuk, és további tisztítás nélkül használjuk fel a következő reakciólépésnél. 132 g nyersteget kapunk (98%-os termelés).

R_f = 0,32 (35%-os termelés)

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,00 (d, J = 7, 6H), 1,46 (s, 9H), 9,65 (s, 1H).

B) Az (amino-/2-szek-butil-etilén/-)fenilalanin-benzilészter-dihidroklorid előállításához 2,00 g (9,29 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-L-izoleucinal és 3,78 g (8,84 mmól) L-fenilalanin-benzilészter-p-tozilát (Chemalog) 150 ml metanolban készült oldatát 3 angströmös molekulaszite (Ventron) jelenlétében kevertetjük 35 percen keresztül szobahőmérsékleten. 0,73 g (11,6 mmól) NaCNBH₃-et adunk hozzá, és a kevertetést egy órán keresztül folytatjuk szobahőmérsékleten. A molekulaszitát kiszűrjük, a szűrletet olajos maradékig pároljuk, amit telített vizes NaHCO₃ oldattal hígítunk és kétszer éterrel extrahálunk. Az egyesített éteres extraktumot Na₂SO₄-tal szárítjuk, és olajos maradékig pároljuk, amit gyors-kromatográfiával tisztítunk eluensként 12% etil-acetátot tartalmazó hexánt használva. 1,69 g (t-butil-oxi-karbonil/-amino-/2-szek-butil-etilén/-)fenilalanin-benzilésztert nyerünk olaj formájában (40%-os kinyerés).

R_f = 0,28 (25% etil-acetát hexánban).

Az olajos anyag állás közben kristályosodik.

Op.: 53-55°C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,6-1,0 (m, 6H), 1,48 (s, 9H), 2,92 (d, J = 7, 2H), 5,07 (s, 2H), 7,17 (s, 5H), 7,25 (s, 5H).

2,94 g (6,47 mmól) (t-butil-oxi-karbonil/-amino-/2-szek-butil-etilén/-)fenilalanin-benzilésztert 110 ml 4 N sósavas dioxánban oldunk, és az oldatot 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük, a levegő nedvességétől CaCl₂ csővel védve. Az oldószert csökkentett nyomáson éteres azeotróp formájában eltávolítjuk és a maradékot éterben eldörzsölve, 2,65 g fehér szilárd anyagot kapunk. A termék 95%-ában a védőcsoport eltávolított. Op.: 183-184°C.

R_f = 0,73 (butanol/víz/ecetsav, 4 : 1 : 1).

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,00 (széles d, 6H), 5,13 (s, 2H), 7,1–7,5 (m, 10H).

C) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-N-benzil-oxi-karbonil-fenil-alanin/-benzilészter előállításához 1,55 g (3,63 mmól) (amino-/2-szek-butil-etilén/)-fenilalanin-benzilészter-dihidrokloridot szuszpendálunk 40 ml metilén-kloridban. 0°C hőmérsékletre hűtjük, és ezen a hőmérsékleten semlegesítjük 0,808 g (7,99 mmól) trietil-aminnal. 1,00 g (3,63 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatint és 0,74 g (5,45 mmól) N/-hidroxibenzotriazolt, majd 2 ml metilén-kloridban 0,74 g (3,63 mmól) diciklohexil-karbodiimidet adunk 0°C hőmérsékleten a szuszpenzióhoz, és a reakciókeveréket 3 órán keresztül kevertetjük ezen a hőmérsékleten; majd 16 órán át szobahőmérsékleten. A kivált csapadékot kiszűrjük, a szűrletet bepároljuk és 125 ml etil-acetátban kevertetjük. A nem oldódó anyagot ismét kiszűrve, az etil-acetátos fázist 135 ml telített vizes NaHCO₃ oldattal mossuk, nátrium-szulfáttal szárítjuk és bepárolva, habos anyagot kapunk. A habos terméket gyors-kromatografálással tisztítjuk, eluensként 35% etil-acetátot tartalmazó hexánt használva. 1,96 g tisztított (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-fenilalanin-benzilészterhez jutunk habos anyag formájában (88%-os kinyerés). R_f = 0,58 (etil-acetát/hexán, 1 : 1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,6–1,1 (m, 12H), 1,5 (s, 9H), 4,88 (d, J = 9, 1H), 5,06 (s, 2H), 7,15 (s, 5H), 7,25 (s, 5H).

1,91 g (3,12 mmól) tisztított (N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin)-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-fenilalanin-benzilészter 16 ml dioxánban 67 mikroliter (0,80 g, 4,68 mmól) benzil-oxi-karbonil-kloriddal (Chemalog) acilezünk. Telített vizes NaHCO₃ oldattal a kémhatást pH = 8 értéken tartva. Amikor a vékonyrétegekromatografiás vizsgálatok szerint valamennyi kiindulási anyag átalakult, a dioxánt csökkentett nyomáson eltávolítjuk, és a vízzel hígított maradékot etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos extraktumot MgSO₄-tal szárítva és bepárolva, a bepárolási maradékot gyors-kromatografálással tisztítjuk, 2,06 g fehér habos anyagot nyerve. R_f = 0,7 (etil-acetát/hexán 1 : 1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,6–1,0 (m, 12H), 1,47 (s, 9H), 7,0–7,4 (m, 15H).

D, G) Az 5. példa F–J) reakciólépéseinél leírtakhoz hasonlóan 2,03 g (2,72 mmól), az előző, C) lépésnél tisztított (N-/t-butil-oxi-karbonil-fenilalanin/-benzilésztert 0,595 g tisztított (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-N-benzil-oxi-karbonil-fenilalanin/-benzilészterrel alakítjuk. A termékhez habos anyag formájában jutunk.

R_f = 0,36 (5% metanol kloroformban).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,6–1,0 (m, 12H), 1,38 (s, 9H), 6,75 (s, 1H), 7,1–7,3 (m, 20H), 7,38 (s, 1H).

H) A kívánt (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-fenilalanin ecetsavas sójának előállításához 150 mg (0,15 mmól) (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-sztatin-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-N-benzil-oxi-karbonil-fenilalanin/-benzilésztert 4 ml etanol/ecetsav 1 : 1 arányú elegyében oldunk, és 18 mg 10%-os

Pd/C katalizátort adunk hozzá. A keveréket 12 órán keresztül hidrogénezzük szobahőmérsékleten 2,9 bar nyomású hidrogéngáz alatt.

A keveréket szűrjük, a szűrletet szilárd anyaggig (128 mg) pároljuk, amit éterben eldörzsölve 109 mg kívánt végterméket kapunk (84%-os kinyerés). Op.: 117–126°C.

R_f = 0,57 (butanol/víz/ecetsav 4 : 1 : 1).

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz): δ 0,8–1,0 (m, 12H), 1,36 (s, 9H), 1,92 (s, 6H), 2,2–2,45 (m, 2H), 4,28 (dd, J = 9, és 4, 1H), 3,54 (széles t, 1H), 6,92 (s, 1H), 7,2–7,4 (m, 10H), 7,63 (s, 1H).

9. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-Phe)-His-ciklosztatin-Lys-Phe előállítását az alábbi reakciólépéseken keresztül végezzük.

A) A (III) képletű N-/t-butil-oxi-karbonil/-ciklosztatin előállításához 10,02 g (9,70 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil/-4(S)-amino-3(S)-hidroxil-5-fenil-pentán-savat oldunk 200 ml metanolban, és 6,5 ml jég-acetetet valamint 1,5 g 10%-os Rh/C katalizátort adva az oldathoz, nyolc órán keresztül hidrogénezzük szobahőmérsékleten 3,2 bar nyomású hidrogéngáz alatt. A keveréket megsűrjük, a szűrletet bekoncentráljuk, és a kapott fehér szilárd anyagot hexánban eldörzsöljük, 8,46 g tisztított terméket nyerve (83%-os kinyerés). Op.: 109–110°C.

R_f = 0,72 (kloroform/metanol/ecetsav, 18 : 2 : 1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H), 2,55 (d, J = 6, 2H).

B) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatin-lizin-fenilalanin előállítását az 1. példában leírtak szerint végezzük, de az N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin helyett N-/t-butil-oxi-karbonil/-ciklosztatint használunk.

¹H-NMR (CD₃OD): 1,50 (s, 9H, BOK).

10. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-prolin)-fenilalanin-hisztidin-ciklosztatin-lizin-fenilalanin előállításához az 1. példa A–F) reakciólépése szerint hisztidin-ciklosztatin-(N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin/)-fenilalanin-benzilészter-dihidrokloridot állítunk elő, oly módon, hogy az N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin helyett N-/t-butil-oxi-karbonil/-ciklosztatint használunk. A kívánt terméket az 1. példa G) és H) reakciólépésénél leírtak szerint állítjuk elő, de az N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin helyett (N-/t-butil-oxi-karbonil/-prolin)-fenilalanin (kereskedelmi forgalomból beszerezhető) használunk. Szilikagélén, kloroform/-metanol 95 : 5 eluens használva. Szilikagélén, kloroform/metanol 95 : 5 eluens használva, kromatografálással tisztítjuk az anyagot, szilárd, tisztított terméket nyerve.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1,49 (s, 9H, BOK).

11. példa

A 8. példában leírtak szerint, de N-/t-butil-oxi-karbonil/-sztatin helyett N-/t-butil-oxi-karbonil/-ciklosztatint használva, az (N-/t-butil-oxi-karbonil/-fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatin-(amino-/2-szek-butil-etilén/)-fenilalanin ecetsavas sóját állítjuk elő. Op.: 150–153°C. (bomlik)

$R_f = 0,50$ (butanol/ecetsav/víz 4 : 1 : 1, ninhidrinnel előhívva).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0,6–2,4 (m, 23H), 1,37 (s, 9H), 7,1–7,4 (11H), 6,95 (s, 1H), 7,70 (s, 1H).

12. példa

Az 1. példában leírtak szerint, de az L-fenil-alanin-benzilészter-p-toluolszulfonát helyett sztatín-benzilészter-hidrokloridot és az N-/t-butil-oxi-karbonil-/sztatín helyett N-/t-butil-oxi-karbonil-/ciklosztatint használva (N-/t-butil-oxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín-lizin-sztatint állítunk elő.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

13. példa

Az (N-/t-butil-oxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín-(3-metoxi-karbonil-1,2,3,4-tetrahidro-2-izokinolin) előállítását a következő reakciólépéseken keresztül végezzük.

A) Az (N-/t-butil-oxi-karbonil-/ciklosztatín)-/3-metoxi-karbonil-1,2,3,4-tetrahidro-2-izokinolint/ az 1. példa C) reakciólépése szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy az N-/t-butil-oxi-karbonil-/sztatín helyett 190 mg (0,60 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil-/ciklosztatint és az (N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzilészter-hidroklorid helyett 137 mg (0,60 mmól) 3-metoxi-karbonil-1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-hidrokloridot használunk. A kapott 301 mg habos terméket további tisztítás nélkül használjuk fel a következő lépésnél.

B) Az 1. példa D–H) reakciólépésénél leírtak szerint 391 mg (N-/t-butil-oxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín-(3-metoxi-karbonil-1,2,3,4-tetrahidro-4-izokinolin)-t állítunk elő. A hab formájában nyert terméket szilikagélén kromatografálva tisztítjuk, eluensként kloroform/metanol elegyet használva. Így 138 mg tisztított termékhez jutunk fehér szilárd anyag formájában.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,5 (s, 9H, BOK).

14–18. példa

A 13. példában leírtak szerint, de a 3-metoxi-karbonil-1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin helyett a megfelelő izokinolin-, kinolin- vagy piperidinszármazékot használva az alábbi (N-/t-butil-oxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín- R^1 képletű vegyületeket állítunk elő.

Pél- da	R^1	TGO $^1\text{H NMR}$ - spektrum (CD_3OD), δ értékei
14.	1,2,3,4-tetrahidro-2-izokini- linil	1,5 (9H, s), 6,8– 7,9 (11H, m)
15.	3-amino-karbonil-1,2,3,4- tetrahidro-2-izokinolinil	1,5 (9H, s)
16.	1,2,3,4-tetrahidro-1-kino- linil	1,5 (9H, s), 6,85 7,8 (11H, m)
17.	4-fenil-metil-1-piperidinil	1,5 (9H, s), 7,0– 7,30 (10H, m)
18.	3-metoxi-karbonil-1,2,3,4,5-, -6,7,8-dekahidro-2-izokinolinil	1,5 (9H, s), 3,8 (3H, s)

19. példa

Az (N-/t-butiloxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín-prolin-metil-észter előállítását az alábbi reakciólépéseken keresztül végezzük.

A) Az 1. példa C) reakciólépése szerint 3,945 g fehér, szilárd (N-/t-butiloxi-karbonil-/ciklosztatín)-prolin-metil-észtert állítunk elő, azzal a különbséggel, hogy az N-/t-butil-oxi-karbonil-/sztatín helyett 3,15 g (10 mmól) N-/t-butil-oxi-karbonil-/ciklosztatint az (N-epszilon-benzil-oxi-karbonil-lizin)-fenilalanin-benzil-észter-hidroklorid helyett 1,65 g (10 mmól) prolin-metilészter-hidrokloridot használunk.

B) Az 1. példa D–H) reakciólépésénél leírtak szerint (N-/t-butil-oxi-karbonil-/fenilalanin)-hisztidin-ciklosztatín-prolin-metil-észtert állítunk elő.

$^1\text{H-NMR}$ -spektrum (CD_3OD): δ 1,5 (9H, s), 3,8 (3H, s), 7,2 (5H, s).

20. példa

A renin angiotenzinogént hasító aktivitásának in vitro gátlását az alábbiak szerint vizsgáljuk.

Az egészséges személyektől nyert vérplazmát felhasználásig fagyaszttva tároljuk. Felhasználás előtt kellő mennyiségű plazmát felolvasztunk és centrifugáljuk. A felülúszót proteázgátlókkal keverjük össze, és a kémhatást pH = 7,4 értékre állítjuk. A plazmafelülúszó különböző mennyiségeihez renin-gátlókat adunk különböző töménységben, és a kapott keverékeket (310 lambda) három órán keresztül 37°C hőmérsékleten tartjuk, olyan kontrollal együtt, ami renin-gátlót nem tartalmaz. Az inkubáció után a reakciót jeges víz hozzáadásával leállítjuk, és a mintákat az angiotenzin I szempontjából vizsgáljuk angiotenzin I antitestekkel. A renin-gátló jelenlétében történő angiotenzin I termelődését összehasonlítjuk az inhibítor nem tartalmazó minták angiotenzin I termelődésével, és a gátlás mértékét százalékosan fejezzük ki. A különböző gátlókoncentrációk párhuzamos kísérleteiből megállapítjuk azt a koncentrációt, ami a renin angiotenzinogén hasító aktivitásának ötvenszázalékos gátlását okozza, azaz az IC_{50} értéket, és ezt valamennyi vizsgált gátlóra meghatározzuk.

A kioltott reakciójú minta angiotenzinogén I mennyiségét rádióimmun vizsgálatokkal állapítjuk meg, a Becton Dickonson and Co. (Orangeburg, N. Y., USA) cég renin-radioimmunassay készletét használva. Ezt a radioimmun vizsgálatot Haber és munkatársai fejlesztették ki (J. Clin. Endocrin. (1969) 29, 1349–1355).

Az említett eljárást alkalmazva, a renin-gátlás hányadosát az 1–5. és 7–20. példában előállított vegyületekre határoztuk meg. Az IC_{50} érték minden esetben kisebb volt a literenkénti 50 mikromólnál.

21. példa

Az exogén renin által kiváltott vérnyomásemelkedés antagonizmusát in vivo az alábbiak szerint vizsgáljuk

230–300 g testsúlyú him Sprague-Dawley patkányokat testsúly-kilogrammonként 65 mg dózisban intraperitoneálisan adott nátrium-pentabariáttal elaltatjuk, majd mindegyik állat comb-venájába és a nyaki verőérbe katétert ültetünk. Folytatva a műtet, az állatot hasonfekvő helyzetbe hozzuk, és folyamatosan mérjük a végbél hőmérsékletét. Az átlá-

gos artériás vérnyomást a nyaki verőér katéterén mérjük egy Statham P 23 D nyomásátvivő és egy fiziográf segítségével. A stabilizálódási idő után testsúly-kilogrammonként 30–80 mU sertés renint adva intravénásan, 20–30 higanymilliméteres, kontrollként tekintett renin vérnyomásemelkedést (dP) kapunk. Miután az átlagos artériás vérnyomás visszatért az alapvonalra, testsúly-kilogrammonként 10 mg renin-gátlót adunk be intravénásan, az állatok a renin-gátló beadását követő 5., 15. és 30. percben a kontroll mérésnél alkalmazott dózisu sertés renint kapnak ismét, és mérjük a kiváltott vérnyomásemelkedést (dP). Az antagonizmus százalékos értékét a következő képlet segítségével számítjuk ki:

$$\frac{(\text{Kontroll dP} - \text{kísérleti dP}) \times 100\%}{\text{kontroll dP}}$$

ahol a kontroll dP és a kísérleti dP az átlagos artériás vérnyomás változása a renin-gátló beadása előtt, illetve után. Minden kísérletnél legalább három állatot használunk, és az értékeket átlagoljuk.

A fenti eljárást alkalmazva, megállapíthatjuk a találmányban szereplő vegyületek százalékos antagonizmusát a renin által kiváltott vérnyomásemelkedéssel szemben.

22. példa

N-(Tercier-butoxi-karbonil)-Phe-N-metil-His-cSta-Lys-Phe

a) lépés

N- α -(Tercier-butoxi-karbonil)-N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin-fenil-alanin-benzil-észter

50 ml 0°C hőmérsékletű diklór-metánban egymás után, az alábbi sorrendben feloldunk 162 mg (1,2 mmól) 1-hidroxi-benzotriazolt, 101,2 mg (1 mmól) N-metil-morfolint, 428 mg (1 mmól) L-fenil-alanin-benzil-észter-p-toluol-szulfonátot, 456 mg (1,2 mmól) N- α -(tercier-butoxi-karbonil)-N-epszilon-benziloxi-karbonil-L-lizint és 635 mg (1,2 mmól) 80%-os tisztaságú 1-ciklohexil-3-(2-morfolinil-etil)-karbodiimid-meto-p-toluol-szulfonátot, és a kapott oldatot 19 órán át 20°C hőmérsékleten keverjük. Ezután az elegyet 75 ml 5,5%-os, vizes sósavval, utána 75 ml telített, vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd 75 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, és vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. A szárítószeret kiszűrjük, és a szűrletről az oldószer ledesztilláljuk. Ily módon habos anyag formájában 669 mg nyerstermékot kapunk.

¹H-NMR-spektrum (CDCl₃, delta): 1,5 (s, 9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport).

Ezt a nyerstermékot további tisztítás nélkül használjuk fel a következő reakciólépésben.

b) lépés

N-epszilon-Benziloxi-karbonil-lizin-fenil-alanin-benzil-észter-hidroklorid

5,6 g (10 mmól), az a) lépésben leírt módon kapott N- α -(tercier-butoxi-karbonil)-N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin-alanin-benzil-észtert 20°C hőmérsékleten feloldunk 25 ml 4 normál dioxános sósav-oldatban, a reakcióelegyet keverjük, és a reakciót vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követjük (futtató elegy: etil-acetát és hexán elegye). A reakció befejeződése után a terméket dietil-éterrel háromszor kimossuk, majd először 10 ml forró diklór-metánból, majd 30 ml dietil-éterből átkristályosítjuk.

A kristályos anyagot kiszűrjük, dietil-éter és diklór-metán 3 : 1 arányú, lehűtött elegyével háromszor kimossuk, és éjszakán át szobahőmérsékleten szárítjuk. Ily módon fehérszínű, porszerű anyag formájában 4,51 g terméket kapunk.

c) lépés

(N-/tercier-Butoxi-karbonil/-cikloztatin)/N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin/-fenil-alanin-benzil-észter

10 ml diklór-metánban 0°C hőmérsékleten egymás után, az alábbi sorrendben feloldunk 2,46 g (4,44 mmól) a b) lépésben kapott (N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin)-fenil-alanin-benzil-észter-hidrokloridot, 1,4 g (4,44 mmól) N-(tercier-butoxi-karbonil)-cikloztatint, 1,021 g (6,66 mmól) 1-hidroxi-benzotriazolt, 1,980 g (4,44 mmól) morfolinil-etil-ciklohexil-karbodiimidet és 0,801 ml (5,77 mmól) trietil-amint. A reakcióelegyet éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd a kapott oldatot az a) lépésben leírt módon dolgozzuk fel. Ily módon halványsárga színű, szilárd anyag formájában 4,22 g terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részleges spektrum):

1,45 (s, 9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport), 0,8–1,9 (átfedő m), 2,2–2,5 (m, 2H), 3,05–3,2 (m, 4H), 3,6–3,92, 4,0, 4,35, 4,72 4,88 és 5,0 (m, 1–11H), 5,0–5,2 (m, 4H), 6,45 és 6,55 (d, 1H–11H), 7,03 (m, 2H), 7,2–7,5 (m, aromás).

d) lépés

Cikloztatin-(N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin)-fenil-alanin-benzil-észter-hidroklorid

2,144 g (2,63 mmól), a c) lépésben leírt módon kapott (N-/tercier-butoxi-karbonil/-cikloztatin)/N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin/-fenil-alanin-benzil-észtert feloldunk 4 normál dioxános sósav-oldatban, és az oldatot 1 órán át 20°C hőmérsékleten állni hagyjuk. Ezután az elegyet a b) lépésben leírt módon dolgozzuk fel, ily módon fehérszínű, porszerű anyag formájában 1,80 g terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,7–0,9 (m, 2H), 1,0–1,8 (m, 12–14H), 2,38 és 2,57 (dd, 1–11H), 2,9–3,1 (m, 4–5H), 3,2, 3,9 5,63 (m, 1–11H), 4,25 és 4,52 (dt, 1–11H), 5,0–5,2 (m, 4H), 7,15–7,45 (m, körülbelül 13H), 7,82 (széles, 3H), 8,2 és 8,52 (d, 1–11H).

e) lépés

(N- α -(tercier-Butoxi-karbonil-fenil-alanin)/N-im-/tercier-butoxi-karbonil/-N-metil-hisztidin)-cikloztatin-/N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin/-fenil-alanin-benzil-észter

e1) lépés

N-Metil-L-hisztidin-metil-észter-dihidro-klorid

1 g N-metil-L-hisztidint feloldunk metanolban, és az oldatba 0°C hőmérsékleten néhány percen át gázalakú sósavat vezetünk. Utána az elegyet másfél órán át forraljuk, és közben többször újra sósavat vezetünk bele. Ezután az oldatot lehűtjük, és az oldószer csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A termék nagyfelbontású folyadék-kromatográfiás vizsgálata azt mutatja, hogy az elegyben körülbelül 7% mennyiségű reagálatlan kiindulási anyag maradt.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum): 2,62 (s, 3H, N-CH₃), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,37 (AB dublettek, 2H, átfed a víz jelével), 4,48 (t, 1H), 7,51 (s, 1H, imidazolil H-4), 7,98 (s, 1H), (imidazolil-H-1).

e₂) lépés

N-(tercier-Butoxi-karbonil)-fenil-alanin-N-metil-hisztidin-metil-észter

1,05 g az e₁) lépésben leírt módon kapott N-metil-L-hisztidin-metil-észtert feloldunk diklór-metánban, és az oldathoz 0°C hőmérsékleten hozzáadunk először 1,25 ml trietil-amint, majd 1,14 g N-(tercier-butoxi-karbonil)-L-fenil-alanint, ezután 1,04 g 1-hidroxi-benzotriazol-hidrátot, és végül 0,89 g diciklohexil-karbodiimidet. Az elegyet 0°C hőmérsékleten keverjük, majd 4–5 óra alatt hagyjuk lassan 20°C hőmérsékletre melegedni. Utána a reakcióelegyet további 10 órán át keverjük, majd a szilárd részeket kiszűrjük, és a szűrletről az oldószert ledesztilláljuk. A maradékot feloldjuk 100 ml etil-acetátban, az oldhatlan részeket kiszűrjük, a szűrletet kétszer 10 ml 1 normál nátrium-hidroxid-oldattal mossuk, és magnézium-szulfáton megszáritjuk. Ezután az oldószert ledesztilláljuk, így módon majdnem fehérszínű szilárd anyag formájában 0,84 g terméket kapunk. Ezt a terméket etil-acetátból átkristályosítva színtelen, porszerű anyag formájában 0,47 g cím szerinti vegyületet kapunk. További terméket kapunk az alábbi módon:

Az etil-acetátból átkristályosított terméket és a kiszűrt szárítószert egyesítjük, metanollal melegítjük, és a kapott szuszpenziót lehűtjük. A szilárd részeket kiszűrjük, és a szűrletről az oldószert ledesztilláljuk. A kapott szilárd anyagot szilikagélén kromatografáljuk, eluensként etanol és diklór-metán elegyét használjuk. Így módon tiszta állapotban 0,857 g cím szerinti vegyületet kapunk.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részletes spektrum):

1,39 (s, 9H, terciér-butoxi-karbonil), 280 (s, 3H, N-CH₃), 2,90 és 3,03 (m), 3,35 (m, 1H), 3,70 (s, 3H, OCH₃), 4,75 (dt, 1H), 5,15 (dt, 1H), 5,3 (d, BOCNH), 6,84 és 7,68 (1-1H, imidazolil-CH), 7,1–7,4 (m, aromás).

A 7,55-nél és 6,74-nél megjelenő szingulették (imidazolil CH-jelek) arra utalnak, hogy a terméknek körülbelül 10%-a a második rotamer formában van.

e₃) lépés

N-(tercier-Butoxi-karbonil)-fenil-alanin-N-metil-N-im-tercier-butoxi-karbonil-hisztidin

2,32 g, az e₂) lépésben leírt módon kapott terméket feloldunk 70 ml acetón és 20 ml víz elegyében, az oldatot 0°C hőmérsékletre hűtjük, és hozzáadunk 5,4 ml 1 normál nátrium-hidroxid-oldatot. Az elegyet 3,3 órán át 0°C hőmérsékleten, majd további 15 órán át –20°C hőmérsékleten tartjuk. Ezután az oldatot részlegesen betöményítjük, és a maradék vizes oldat pH-ját 1 normál sósavval 5,8-ra állítjuk. A szabad sav nem válik ki az oldatból, ezért az elegy pH-ját 6 normál nátrium-hidroxid-oldattal 11-re állítjuk, és térfogatát vízzel 30 ml-re egészítjük ki. A kapott oldathoz hozzáadunk 30 ml dioxánt, és 0°C hőmérsékleten hozzáadunk 1,61 ml di-tercier-butil-

5

-dikarbonátot, mégpedig oly módon, hogy eközben az elegy pH-ját 6 normál nátrium-hidroxid-oldat időnkénti adagolásával 9 és 11 között tartjuk. Az elegyet körülbelül 1 órán át 0°C hőmérsékleten tartjuk, majd a hűtőfürdőt eltávolítjuk és az elegyhez hozzáadunk további 0,5 ml di-tercier-butil-dikarbonátot.

10

Negyedóra múlva az elegyet részlegesen betöményítjük, majd etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos részt vízzel mossuk, majd a vizes részeket egyesítjük, tiszta etil-acetátot adunk hozzájuk, és az egész elegy pH-ját 0°C hőmérsékleten, 6 normál sósavval 1,4-re állítjuk. A szerves részt elválasztjuk, majd vízzel mossuk, nátrium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert ledesztilláljuk. A kapott olajról homogenizálás céljából többször dietil-étert desztillálunk le, így módon végül amorf, habos anyag formájában 1,9 g cím szerinti vegyületet kapunk, amely a fordított fázisú, nagyfelbontású folyadék-kromatográfiás vizsgálat szerint legalább 95%-os tisztaságú.

20

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részleges spektrum):

25

1,30 és 1,35 (s, összesen 9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport a rotációs izomerekben), 1,60 és 1,69 (az imidazolgyűrű nitrogénatomjához kapcsolódó terciér-butoxi-karbonil-csoport jelei az egyes izomerekben, összesen 9H), 2,82 és 2,98 (s, összesen 3H, N-CH₃), 3,32 és 3,10 (AB d, 1-1H), 4,83 (dt, 1H), 5,27 (m, 1H), 5,42 és 5,48 (d, összesen 1H, Boc-NH), 7,1–7,35 (m, aromás), 7,93 és 8,08 (s, összesen 1H, imidazolil-H-2).

30

e₄) lépés

(N- α -tercier-Butoxi-karbonil-fenil-alanin)-N-im-tercier-butoxi-karbonil-N-metil-hisztidin)-ciklo-sztatin-N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin)-fenil-alanin-benzil-észter

40

3,0 ml diklór-metánban 0°C hőmérsékleten, egymás után, az alábbi sorrendben feloldunk 0,976 g (1,37 mmól), a d) lépésben leírt módon kapott ciklosztatin-(N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin)-fenil-alanin-benzil-észter-hidrokloridot, 0,799 g (1,55 mmól), az e₃) lépésben leírt módon kapott N-(tercier-butoxi-karbonil)-fenil-alanin-N-metil-N-im-tercier-butoxi-karbonil-hisztidint, 0,310 g (1,55 mmól) diciklohexil-karbodiimidet, 0,247 ml trietil-amint és 0,378 g (2,47 mmól) 1-hidroxi-benzotriazolt, és az elegyet 20 órán át 0°C hőmérsékleten keverjük. Utána a reakcióelegyet az a) lépésben leírt módon dolgozzuk fel, így módon fehérszínű habos anyag formájában 0,930 g terméket kapunk.

50

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

55

1,24, 1,28 és 1,32 (s, összesen 9H), terciér-butoxi-karbonil-csoport jelei az egyes izomerekben), 1,44, 1,48 és 1,52 (s, összesen 9H, az imidazolgyűrű nitrogénatomjához kapcsolódó terciér-butoxi-karbonil-csoport jelei az egyes izomerekben), 2,76, 2,96 és 3,02 (s, izomer N-CH₃), 2,90 (m, 24H), 3,82, 3,86, 4,52, 4,80 (m, 1-1H), 4,95–5,10 (m, 4H, CH₂), 7,15–7,45 (m, aromás), 7,72, 7,84, 8,45 (m, 1-1H), 8,04 és 8,10 (s, összesen 1H, imidazolil H-2).

60

f) lépés

(N- α -tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin/-N-im-
-tercier-butoxi-karbonil/-N-metil-hisztidin)-cikloszta-
tin-lizin-fenil-alanin

470 mg (0,387 mmól), az e) lépésben leírt mó-
don kapott (N- α -tercier-butoxi-karbonil-fenil-alan-
in/-N-im-tercier-butoxi-karbonil/-N-metil-hisztidin)-
ciklosztatin-N/-N-epszilon-benziloxi-karbonil-lizin/-
-fenil-alanin-benzil-észtert hozzáadunk 20 ml metan-
ol és 2 ml ecetsav elegyéhez, majd az elegyhez 80
mg 20%-os csontszén-palládium-hidroxid-katalizá-
tort adunk. A reakcióelegyet Super-Cel szűrőrétegen
átszűrjük, és a szűrletről az oldószert ledesztilláljuk.
Ily módon fehérszínű, porszerű anyag formájában
337 mg terméket kapunk,

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részleges
spektrum):

1,29, 1,27 és 1,25 (s, összesen 9H, terciér-butoxi-
-karbonil-csoport jelei az egyes izomerekben),
1,42, 1,48 és 1,50 (s, összesen 9H, az imidazol-
gyűrű nitrogénatomjához kapcsolódó terciér-bu-
toxi-karbonil-csoport jelei az egyes izomerekben),
2,75, 2,95 és 3,02 (s, izomer N-CH₃), 4,22, 4,52
5,05, 5,25, 7,66, 7,84 (m, 1-1H), 7,0–7,3 (m,
aromás), 7,32 és 7,42 (s, összesen 1H, imidazolil
H-4 jelek az egyes izomerekben), 8,03 és 8,10
(s, 1H összesen, imidazolil H-2 jelek az egyes izo-
merekből).

g) lépés

N-(tercier-butoxi-karbonil)-Phe-N-metil-His-cSta-Lys-
Phe

20 ml metanolhoz hozzáadunk 358 mg (0,341
mmól), az f) lépésben leírt módon kapott terméket
és 94 mg (0,682 mmól) kálium-karbonátot. A reakció
2,5 óra alatt lejátszódik, ezután az elegyhez hozzá-
adunk 200 ml ecetsavat. Utána az elegyet 1 ml tér-
fogatra betöményítjük, a maradékhoz hozzáadunk
150 ml ecetsavat és 1 ml 0,1 mólis ammónium-ace-
tát-oldatot (pH = 4,3) és az izomereket nagyfelbon-
tású folyadék-kromatográfiás módszerrel szétválaszt-
juk. Az L-hisztidint tartalmazó izomert eldörzsölve
fehérszínű, porszerű anyagot kapunk.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részleges
spektrum):

delta_{DMS} = 0 : 1,29 (s, 9H, terciér-butoxi-karbo-
nil-csoport), 2,86 és 3,05 (s, összesen 3H, N-CH₃),
6,75 és 6,85 (s, összesen 1H, imidazolil H-4-
a két rotációs izomerben), 7,51 (imidazolil-H-2).

23. példa

(N-tercier-butoxi-karbonil/-Phe)-N-metil-His-Sta-Ile-
-Phe

a) lépés

N-im-tercier-butoxi-karbonil/-N-metil-hisztidin

600 mg (2,93 mmól) ismert módon előállított (J.
Med. Chem. /1968/, 11 258–260) N-metil-hisztidint,
1,65 ml (11,2 mmól) trietil-amint, 1,48 ml (6,4
mmól) terciér-butoxi-karbonil-azidot, 8,5 ml 10%-os
nátrium-hidrogén-karbonátot és 10 ml 2 normál só-
savat feloldunk 5 ml dimetil-formamidban. A reakció
lejátszódása után a dimetil-formamidot ledesztillál-
juk, és a maradékhoz hozzáadunk 15 ml etil-acetátot
és 15 ml 10%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot.
Az elegyet kétszer 5 ml etil-acetáttal mossuk, majd 8

ml 2 normál sósavval megsavanyítjuk, és négyszer 20
ml etil-acetáttal kirázzuk. Az etil-acetátos részt teli-
tett nátrium-klorid-oldattal mossuk és megszáritjuk.
Az oldószert ledesztillálása után habos anyag formá-
jában 846 mg terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (60 MHz, CDCl₃, részleges spek-
trum):

1,4 (s, 9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport), 1,6 (s,
9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport), 2,8 (s, 3H,
N-CH₃), 2,85 (m, 1H), 3,15 (m, 1H), 4,75 (m,
1H), 7,2 és 8,1 (s, 1–1H, imidazolil-CH).

b) lépés

(N-im-tercier-butoxi-karbonil/-N-metil-hisztidin)-Sta-
-Ile-Phe-benzil-észter

8 ml diklór-metánhoz hozzáadunk 179 mg (0,43
mmól) sztatín-izoleucin-fenil-alanin-benzil-észter-hid-
rokloridot, 316 mg (0,65 mmól), az a) lépésben le-
írt módon előállított N-im-tercier-butoxi-karbonil-
-N-metil-hisztidint, 91 μ l trietil-amint, 165 mg (1,07
mmól) 1-hidroxi-benzotriazol és 134 mg (0,65
mmól) dikiklohexil-karbodiimidet. A reakció körül-
belül 7 óra alatt játszódik le. Ezután a reakcióelegyet
diklór-metánnal hígítjuk, a szilárd részeket kiszűrjük,
és a szűrletről az oldószert ledesztilláljuk. A mara-
dékat 40 ml etil-acetáttal kivonatoljuk, az oldatlan
részeket kiszűrjük, a szűrletet kétszer 5 ml 1 normál
nátrium-hidroxid-oldattal, majd telített nátrium-klo-
rid-oldattal mossuk és nátrium-szulfonáton megszá-
rítjuk. Utána az oldószert ledesztilláljuk, ily módon
habos anyag formájában 235 mg terméket kapunk,
hozam: 62%.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részleges spek-
trum):

0,82 (m, 12H), 1,45 (s, 9H, terciér-butoxi-karbo-
nil-csoport), 1,60 (s, 9H, az imidazolgyűrű nitro-
génatomjához kapcsolódó terciér-butoxi-karbonil-
-csoport), 1,80, 2,33, 2,52, 2,91, 3,24, 3,67,
4,05, 4,25, 6,82 (m, 1–1H), 2,93 (s, 3H, N-CH₃),
3,12 (m, 2H), 4,8–5,0 (m, 2H), 5,13 (AB dub-
lettek, CH₂O), 7,0–7,4 (m, 12–15H), 7,96 (s,
1H, imidazolil H-2).

c) lépés

N-Metil-His-Sta-Ile-Phe-benzil-észter-hidroklorid

228 mg (0,26 mmól), a b) lépésben leírt módon
kapott terméket feloldunk 4 normál dioxános sósav-
oldatban. Ily módon a cím szerinti vegyülethez jut-
unk.

¹H-NMR-spektrum: (250 MHz, DMSO-d₆, részleges
spektrum):

0,7–0,95 (m, 12H), 3,03 (m, 2H), 3,8 (m, 2H),
4,25 (m, 2H), 4,55 (m, 1H), 5,05 (AB dublett,
2H, OCH₂), 7,1–7,4 (m, 12H), 7,50 (s, 1H, imi-
dazolil-H-4), 7,85 (d, 1H), 8,6 (m, 2H), 8,8 (széles
1H).

d) lépés

(N-tercier-butoxi-karbonil/-Phe)-N-metil-His-Sta-Ile-
-Phe-benzil-észter

1 ml diklór-metán és 1 ml dimetil-formamid ele-
gyéhez hozzáadunk 100 mg (0,133 mmól), a c)
lépésben leírt módon kapott terméket, 41 mg (0,154
mmól) terciér-butoxi-karbonil-fenil-alanint, 50 μ l

(0,35 mmól) trietil-amint, 35 mg (0,231 mmól) 1-hidroxi-benzotriazol és 32 mg (0,154 mmól) diklohexil-karbodiimidet. A reakció lejátszódása után a reakcióelegyet az 1. példában leírt módon dolgozzuk fel, így módon szilárd anyag formájában 74 mg terméket kapunk, hozam: 57%.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részleges spektrum):

0,75–0,95 (m, 12H), 1,35 és 1,40 (s, összesen 9H, nem egyenértékű tercier-butoxi-karbonil-csoportok a két rotamer formában), 3,0 (s, N-CH₃), 3,13 (m, 2–3H), 3,95 4,25, 4,8 és 4,9 (m), 5,10 (AB dublett, OCH₂, 2H), 6,7 (széles, 1H), 7,0–7,4 (aromás m).

e) lépés

(N-/tercier-Butoxi-karbonil-/Phe)-N-metil-His-Sta-Ile-Phe

A címszerű vegyületet az 1. példa f) lépésében leírt módon eljárva állítjuk elő.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CD₃OD, részleges spektrum delta-TMS = 0), 0,90 (9H), 1,37 és 1,45 (s, összesen 9H, tercier-butoxi-karbonil-csoport), 2,71, 3,06 (s, összesen 3H, N-CH₃), 4,22 (d, 1H), 7,1–7,3 (m, aromás, 10–12H).

24. példa

(N-/tercier-Butoxi-karbonil-/Phe)-N-metil-His-ciklosztatin-Lys-Sta

a) lépés

N-(tercier-Butoxi-karbonil)-sztatin-benzil-észter

1141 mg (5,12 mmól) N-(tercier-butoxi-karbonil)-sztatin feloldunk 20 ml dimetil-formamidban, és az oldathoz hozzáadunk 708 mg kálium-karbonátot és 0,609 ml benzil-bromidot. A reakció lejátszódása után az oldószert ledesztilláljuk, a maradékot feloldjuk etil-acetátban, az oldatot kétszer 5 ml vízzel mossuk, magnézium-szulfáton megszáritjuk, a száritószert kiszűrjük, és az oldószert ledesztilláljuk. Így módon sárgaszínű olaj formájában 1510 mg terméket kapunk, hozam: 81%.

¹H-NMR-spektrum (90 MHz, CDCl₃, részleges spektrum):

0,92 (d, J = 7 Hz, 6H), 1,42 (s, 9H, tercier-butoxi-karbonil-csoport), 2,58 (m, 2H), 4,05 (m, 1), 4,72 (d, BocNH, 1H), 5,13 (s, CH₂O, 2H), 7,3 (s, 5H, aromás).

b) lépés

Sztatin-benzil-észter-hidroklorid

1490 mg (4,08 mmól), az a) lépésben leírt módon előállított N-(tercier-butoxi-karbonil)-sztatin-benzil-észtert feloldunk 5 ml 4 normál dioxános sósav-oldatban. A dioxánt dietil-éterrel együtt ledesztilláljuk, és a maradékot 50°C hőmérsékleten megszáritjuk. Így módon sárgaszínű olaj formájában 1230 mg terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,84 (d, 6H), 1,42, 1,72 (m, 1H), 2,6 (dd, 1H), 2,78 (dd, 1H), 3,1 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 5,14 (s, 2H, CH₂O), 5,82 (m, 1H), 7,4 (m, 5H), 8,02 (m, 3H).

c) lépés

(N-α-/tercier-Butoxi-karbonil-/N-epszilon-/benziloxi-karbonil-/lizin)-sztatin-benzil-észter

8 ml diklór-metánban 0°C hőmérsékleten egymás után, az alábbi sorrendben hozzáadunk 1200 mg (3,98 mmól), a b) lépésben leírt módon kapott sztatin-benzil-észter-hidrokloridot 8 ml trietil-amint, 1510 mg (5,17 mmól) N-α-(tercier-butoxi-karbonil)-N-epszilon-(benziloxi-karbonil)-lizint (Chemalog), 977 mg (6,37 mmól) 1-hidroxi-benzotriazol és 821 mg (3,98 mmól) diklohexil-karbodiimidet. A reakció lejátszódása után az elegyet az 1. példában leírt módon dolgozzuk fel, így módon fehérszínű, habos anyag formájában 1770 mg terméket kapunk, hozam: 71%.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, CDCl₃, részletes spektrum):

0,92 (d, 6H), 1,42 (s, 9H, tercier-butoxi-karbonil-csoport), 2,54 (m, 2H), 3,20 (m, 2H), 4,00 (m, 3-4H), 5,14 (m, 4-5H), 6,36 (d, 1H), 7,4 (m, 11–13H).

d) lépés

N-epszilon-(Benziloxi-karbonil)-lizin-sztatin-benzil-észter-hidroklorid

1760 mg (2,80 mmól), a c) lépésben leírt módon kapott terméket feloldunk 7 ml 4 normál dioxános sósav-oldatban. Utána a dioxánt ledesztilláljuk, a maradékot dietil-éterrel többször mossuk, majd csökkentett nyomáson, 56°C hőmérsékleten megszáritjuk. Így módon fehérszínű habos anyag formájában 1550 mg terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,86 (m, 6H), 1,36 (m, 4-6H), 1,72 (m), 2,4 (m, 2H), 2,96 (m, 3-4H), 3,8, 3,9 és 3,95 (m, 1-1H), 5,0–5,1 (m, 4-5H), 7,2–7,4 (m, 11-12H), 8,22 és 8,34 (m, összesen 3-4H), 8,50 és 8,84 (m, 1-1H).

e) lépés

(N-/tercier-Butoxi-karbonil-/ciklosztatin)-N-epszilon-/benziloxi-karbonil-/lizin-sztatin-benzil-észter

6 ml diklór-metánhoz 0°C hőmérsékleten egymás után, az alábbi sorrendben hozzáadunk 1530 mg (2,77 mmól), a d) lépésben leírt módon kapott terméket, 874 mg (2,77 mmól) N-(tercier-butoxi-karbonil)-ciklosztatin, 1533 mg (4,16 mmól) 1-hidroxi-benzotriazol, 5,71 mg (2,77 mmól) diklohexil-karbodiimidet és 0,50 ml (3,60 mmól) trietil-amint. Az elegyet 24 órán át 0°C hőmérsékleten keverjük, majd feldolgozzuk, és az oldószert ledesztilláljuk. Így módon fehérszínű, habos anyag formájában 1850 mg terméket kapunk, hozam: 82%.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,90 és 0,94 (d, összesen 6H), 1,0–1,6 (többféle m), 1,38 (s, 9H, tercier-butoxi-karbonil-csoport), 2,15–2,50 (m, 3H), 2,95 (m, 1H), 3,8 és 3,9 (m, 1-1H), 4,18 (m, 1H), 6,64 (d, 1H), 5,0–5,1 (m, 4-5H), 6,35 (d, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,3–7,5 (m, aromás), 7,9 (m, 1H).

f) lépés

Ciklosztatin-N-epszilon-(benziloxi-karbonil)-lizin-sztatin-benzilészter-hidroklorid

1830 mg (2,22 mmól), az e) lépésben leírt módon kapott terméket feloldunk 7 ml dioxános sósav-oldatban. A dioxánt dietil-éterrel ledesztilláljuk, és a maradékot feldolgozzuk. Így módon halványsárga színű habos anyag formájában 1740 mg terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,90 és 0,94 (d, összesen 6H), 1,1–1,6 (m, összesen 20–22H), 8,1–2,6 (m, körülbelül 5H), 2,95 (m, 2H), 3,84 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 5,0–5,1 (m, 4–5H), 7,2–7,5 (m, aromás), 7,6 (d, 1H), 7,8 (m, 2–3H), 8,18 (d, 1H).

g) lépés

(N- α -(tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin)-N-metil-N-im-(tercier-butoxi-karbonil)-hisztidin)-ciklosztatin-lizin-sztatin-benzil-észter

3 ml diklór-metánban 0°C hőmérsékleten, egymás után, az alábbi sorrendben feloldunk 300 mg (0,416 mmól), az 1. példa e₁–e₃) lépésében leírt módon előállított N- α -(tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin)-N-metil-N-im-(tercier-butoxi-karbonil)-hisztidint, 215 mg (0,416 mmól), a fenti f) lépésben leírt módon kapott terméket, 7,5 ml (0,541 mmól) trietil-amint, 96 mg (0,624 mmól) 1-hidroxi-benzotriazolt és 86 mg (0,416 mmól) diciklohexil-karbodiimidet. A reakció lejártszódása után az elegyet feloldjuk etil-acetátban, az oldatlan részeket kiszűrjük, a szűrletet kétszer 1 ml 1 normál nátrium-hidroxid-oldattal, majd egyszer 1 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, és magnézium-szulfáton megszáritjuk. Így módon fehérszínű, habos anyag formájában 341 mg terméket kapunk, hozam: 89%.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részletes spektrum):

0,88 (két d, 6H), 1,36 és 1,52 (s, 9–9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport, és az imidazolgyűrű nitrogénatomjához kapcsolódó terciér-butoxi-karbonil-csoport), 2,6–3,2 (több m), 3,58, 3,84 és 4,46 (m, 1–1H), 4,0–4,2 (m, körülbelül 4H), 7,05 (d, 1H), 7,0–7,3 (m, aromás), 7,56 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 8,07 (s, 1H, imidazolil H-2), 8,28 és 8,52 (d, 1–1H).

h) lépés

N- α -(tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin)-N-metil-N-im-(tercier-butoxi-karbonil)-hisztidin-ciklosztatin-lizin-sztatin

326 mg, a g) lépésben leírt módon kapott terméket hozzáadunk 10 ml metanol és 1 ml ecetsav elegyéhez, majd az oldathoz 75 mg csontszénes palládium-hidroxid-katalizátort adunk. A reakció lejártszódása után az elegyet Super-Cel szűrőrétegen átszűrjük, és a szűrletből az oldószert ledesztilláljuk. A maradékot toluollal háromszor mossuk, majd dietil-éterrel eldörzsöljük. Az így kapott terméket nagymértékben csökkentett nyomáson megszáritjuk, így módon fehérszínű habos anyag formájában 255,4 mg terméket kapunk, hozam: 91%.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,82 (két d, összesen 6H), 1,24, 1,28, 1,34, 1,40, 1,48 és 1,52 (tercier-butoxi-karbonil-csoport, és az imidazolgyűrű nitrogénatomjához kapcsolódó terciér-butoxi-karbonil-csoport szingulett-jelei az egyes izomerekben), 2,74, 2,98 és 3,00 (izomer, N-CH₃ jelek), 7,06–7,4 (m, aromás), 7,45 (s, az egyik izomer imidazolil H-4-jel), 8,03 és 8,10 (s, összesen 1H, izomer, imidazolil H-2-jelek).

i) lépés

(N-(tercier-butoxi-karbonil-Phe)-N-metil-His-ciklosztatin-Lys-Sta

2,0 ml metanolhoz hozzáadunk 254 mg (0,239 mmól), a h) lépésben leírt módon kapott terméket és 83 mg (0,60 mmól) kálium-karbonátot. Így módon a cím szerinti vegyülethez jutunk.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, DMSO-d₆, részletes spektrum),

delta_{TMS} = 0 : 1,35 (s, 9H, BOC), 0,9 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 2,79 és 3,04 (s, 3H, N-CH₃-jelek a rotációs izomerekben), 6,89 (s, imidazolil H-2), 7,2–7,4 (m, aromás).

25. példa

N- α -(tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin)-hisztidin-ciklosztatin-N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid

a) lépés

tercier-butoxi-karbonil-ciklosztatin-N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil-amid)

2 ml diklór-metánban 0°C hőmérsékleten feloldunk 142 mg (1,22 mmól) 1-(N,N-dimetil-amino)-3-(N'-metil-amino)-propánt, 350 mg (1,11 mmól) N-(tercier-butoxi-karbonil)-ciklosztatint, 255 mg (1,66 mmól) 1-hidroxi-benzotriazolt és 229 mg (1,1 mmól) diciklohexil-karbodiimidet. A reakció befejeződése után az elegyet a 3. példában leírt módon sárgaszínű olaj formájában 472 mg terméket kapunk.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, CDCl₃, részleges spektrum):

0,9 (m, 2H), 1,34 (s, 9H, terciér-butoxi-karbonil-csoport), 1,68 (m), 2,21 és 2,23 (s, összesen 6H, NME₂), 3,40 és 3,33 (t, 1–1H), 3,64 (m, 1H), 4,01 (m, 1H), 4,082 (m, 1H, BocNH).

b) lépés

Ciklosztatin-N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid-dihidroklorid

452 mg (1,09 mmól), az a) lépésben leírt módon kapott terméket feloldunk 5 ml dioxános sósav-oldatban. A reakció lejártszódása után az elegyet a fent leírt módon dolgozzuk fel. Így módon sárgaszínű, habos anyag formájában 470 mg terméket kapunk, hozam: 111%.

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, részleges spektrum):

0,92 (m, 2H), 1,2–2,05 (több m, körülbelül 13H), 2,79 és 2,81 (s, összesen 6H), 2,92 és 3,08 (s, összesen 3H), 4,10 és 5,66 (m, 1–1H), 8,02 (széles, 3H).

c) lépés

(N-/tercier-Butoxi-karbonil-Phe)-N-im-/tercier-butoxi-karbonil-His-cikloztatin-N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid

3 ml diklór-metánban feloldunk 440 mg (1,14 mmól), a b) lépésben leírt módon kapott terméket, 573 mg (1,14 mmól) tercier-butoxi-karbonil-fenil-alanin-N-im-(tercier-butoxi-karbonil)-hisztidint, 262 mg (1,71 mmól) 1-hidroxibenzotriazol, 235 mg (1,14 mmól) diciklohexil-karbodiimidet és 205 μ l (1,48 mmól) trietil-amint. A reakció lejátszódása után az elegyet a fent leírt módon dolgozzuk fel. Ily módon sárgaszínű, habos anyag formájában 790 mg terméket kapunk, hozam: 89%.

¹H-NMR-spektrum (250 MHz, CDCl₃, részletes spektrum):

1,25 és 1,50 (s, 9-9H, tercier-butoxi-karbonil-csoport), 2,07 és 2,10 (s, 3-3H), 2,66 és 2,82

(s, összesen 3H), 3,8 (m, 2H), 4,1 (m, 1H), 4,55 és 4,8 (m, 1-1H), 7,0–7,4 (m, aromás), 8,04 (s, 1H), 8,14 és 8,24 (m, 1-1H),

5

d) lépés

N- α -(tercier-Butoxi-karbonil-fenil-alanin)-hisztidin-cikloztatin-N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid

10

A cím szerinti vegyületet a 3. példa d)-g) pontjában leírttal analóg módon és az N-metil-hisztidin-származék helyett N- α -(tercier-butoxi-karbonil)-fenil-alanin)-N-im-(tercier-butoxi-karbonil)-hisztidint használva állítjuk elő.

15

¹H-NMR-spektrum (300 MHz, DMSO₆, részletes spektrum):delta_{TMS} = 0 : 1,30 (s, tercier-butoxi-karbonil-csoport, 9H), 2,88 (s), 2,96 (s), 3,26 (s), 6,88 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,2–7,3 (m, aromás 5-6H).

I. Táblázat

A kiválasztott vegyületek vizsgálati eredményei

Vegyület	in vitro IC ₅₀	μ nól	mg/kg	in vivo ARM, perc		
	emberi renin	sértés renin		5	15	30
Boc-Phe-His-cSta-N-metil-N-3-(dimetil-amino-1-propil)-amid	0,03	26	1	-26*	-18	-12
Boc-Phe-N-metil-His-cSta-Lys-Phe	0,9	0,5	10	97*	93*	82*
Boc-Phe-N-metil-His-cSta-Lys-Phe			1	61*	24	3
Boc-Phe-His-cSta-Lys-Phe	0,24	0,04	1	100*	63*	44*
Boc-Phe-His-cSta-Lys-Phe			0,075	66*	14	4

* = Statisztikusan szignifikáns.

Az alábbi táblázatban a találmány szerinti néhány vegyület kitermelését és további in vivo renin antagonizáló hatásokat szemléltetünk:

II. táblázat

Példa száma	Kitermelés	IC ₅₀ (μ M), humán renin
9. B	5	0,24
10.	2,5	0,01
11.	7	1,0
12.	11	0,1
13.		3,0
14.	9	0,1
15.	13	1,5
16.	8	2,0
17.	11	3,0
18.	12	4,6
19. A		3,0
B	20	0,08
22.		0,9
23.		2,3
24.		3,0
25.		0,030

40

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az (I) általános képletű peptid-származékok és gyógyászati szempontból alkalmazható sóik – ahol
- W jelentése L-fenilalanin,
- W¹ jelentése L-hisztidin vagy N-metil-hisztidin
- R jelentése 1-6 szénatomos alkoxi-karbonil-csoport,
- R² jelentése izobutil- vagy ciklohexil-metilén-csoport,
- R³ jelentése hidroxil- vagy aminocsoport, és
- R¹ jelentése:
- (i) A-Phe-OH, ahol
- A jelentése L-lizin vagy L-izoleucin,
- (ii) L-izoleucin-sztatin,
- L-izoleucin-4-amino-vajsav,
- 4-amino-(4-szek-butil)-vajsav,
- L-alanin-sztatin-L-glutaminsav,
- (iii) 1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-2-il-csoport,
- (iv) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,
- (v) L-prolin-(1-4 szénatomos)-alkilészter
- (vi) 1,2,3,4,5,6,7,8-dekahidro-3-(metoxi-karbonil)-izokinolin-2-il-csoport,

60

(viii) 4-(fenil-metil)-piperidin-1-il-csoport,
(viii) 1,2,3,4-tetrahidro-3-(amino-karbonil)-izokinolin-
-2-il-csoport,

(ix) 1,2,3,4-tetrahidro-kinolin-1-il-csoport,

(x) L-lizin-sztatin- vagy

(xi) N-metil-N-(3-dimetil-amino-1-propil)-amid —
előállítására, azzal j e l l e m e z v e, hogy

a) valamely (IV) általános képletű — ahol R^1 , R^2 , R^3 , és W^1 jelentése a fenti és az R^1 és R^3 csoportok-
ban jelenlévő reaktív csoportok aa peptidkémiai-
önmagában ismert módon védettek — vegyületet vagy
annak sóját valamely R-L-fenilalanin általános kép-
letű — ahol R a fenti- vagy annak aktivált származéká-
val acilezünk, és az R^1 és R^3 csoportok védőcsoport-
jait szükség esetén lehasítjuk, vagy

b) valamely, a peptidkémiai-önmagában ismert
módon védett (I) általános képletű peptid-származé-
król vagy sójáról ismert módon lehasítjuk a védő-
csoportokat,

és kívánt esetben az (I) általános képletű vegyületet
gyógyászati szempontból alkalmazható sójává alakít-
juk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általá-
nos képletű peptid-származékok előállítására, me-
lekben W^1 jelentése L-hisztidin és W, R, R^1 , R^2 és R^3
az 1. igénypontban megadott, azzal j e l l e m e z v e,
hogy megfelelően helyettesített vegyületekből indu-
lunk ki.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, olyan (I) általá-
nos képletű peptid-származékok előállítására, me-

5

10

15

20

25

30

lyekben R^2 jelentése izobutylcsoport, R^3 jelentése
hidroxilcsoport és W, W^1 , R és R^1 a 2. igénypontban
megadott, azzal j e l l e m e z v e, hogy megfelelően
helyettesített vegyületekből indulunk ki.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általá-
nos képletű peptid-származékok előállítására, me-
lyekben R^2 jelentése ciklohexil-metilén-csoport, R^3
jelentése hidroxilcsoport, és W, W^1 , R és R^1 a 2.
igénypontban megadott, azzal j e l l e m e z v e,
hogy megfelelően helyettesített vegyületekből indu-
lunk ki.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás olyan
(I) általános képletű peptid-származékok előállítására,
melyekben R^1 jelentése L-lizin-sztatin, és B, W, R^1
és R^2 az 1. igénypontban, R^3 a 3. igénypontban és
 W^1 a 2. igénypontban megadott, azzal j e l l e m e z v e,
hogy megfelelően helyettesített vegyületekből
indulunk ki.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általá-
nos képletű peptid-származékok előállítására, me-
lyekben R^1 jelentése L-lizin-L-fenilalanin és R, R^2 ,
 R^3 , W és W^1 az 5. igénypontban megadott, azzal
j e l l e m e z v e, hogy megfelelően helyettesített
vegyületekből indulunk ki.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általá-
nos képletű peptid-származékok előállítására, me-
lyekben R jelentése t-butil-oxi-karbonil-csoport és
W, W^1 , R^1 , R^2 , és R^3 a 6. igénypontban megadott,
azzal j e l l e m e z v e, hogy megfelelően helyettesített
vegyületekből indulunk ki.

1 db rajz

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX

