

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

239907

(11)

(B2)

(22) Přihlášeno 26 06 80  
(21) PV 4584-80

(32) (31)(33) Právo přednosti ad 28 06 79  
(RI-717) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 15 05 85

(45) Vydáno 15 05 87

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 07 K 5/08//  
A 61 K 37/02

(72) Autor vynálezu

(73) Majitel patentu

KISFALUDY LAJOS dr.; SZIRTES TAMÁS, BUDAPEŠT;  
BALÁSPÍRI LAJOS dr., SZEGED; PÁLOSI ÉVA dr.; SPORNY LÁSZLÓ dr.;  
SARKADI ÁDÁM dr., BUDAPEŠT (MLR)  
RICHTER GEDEON VEGYÉSZÉTI GYÁR RT., (BUDAPEŠT) (MLR)

## (54) Způsob výroby tripeptidamidů

Způsob výroby tripeptidamidů obecného  
vzorce I



ve které značí

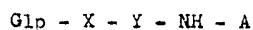
- X L-norleucylovou skupinu, L-leucylovou skupinu, L-norvalylovou skupinu, D-leucylovou skupinu, L-prolylovou skupinu, L-2-aminobutyrylovou skupinu, L-valylovou skupinu, L-threonylovou skupinu, L-isoleucylovou skupinu, L-2-aminodekanoylovou skupinu, L-cyklohexylalanylovou skupinu nebo L-terc.-butylserylovou skupinu a
- Y L-prolylovou skupinu, nebo
- X L-histidylovou skupinu a
- Y L-homoprolylovou skupinu nebo D-piperidylovou skupinu a
- A vodíkový atom nebo alkylovou skupinu s 1 a 10 uhlíkovými atomy nebo alkylovou skupinu substituovanou dimethylaminovým zbytkem s 1 až 3 uhlíkovými atomy v alkylové části, když ale X značí L-leucylovou skupinu, potom má A význam jiný než vodíkový atom,

jakož i terapeuticky použitelných komplexů těchto sloučenin, spočívá v tom, že se amid aminokyseliny obecného vzorce Y-NH-A, ve kterém mají Y a A shora uvedený význam, acyluje popřípadě chráněným L-aminokyselinovým zbytkem požadovaným pro substituent X a získaný dipeptid se acyluje L-pyroglu-

tamovou kyselinou, popřípadě jejím chráněným a/nebo aktivovaným derivátem a popřípadě se ochranná skupina odštěpí.

239907

Vynález se týká způsobu výroby nových, na centrální nervový systém působících tripeptidamidů obecného vzorce I



(I),

ve kterém značí

- X L-norleucylovou skupinu, L-leucylovou skupinu, L-norvalylovou skupinu, D-leucylovou skupinu, L-prolylovou skupinu, L-2-aminobutyrylovou skupinu, L-valylovou skupinu, L-threonylovou skupinu, L-isoleucylovou skupinu, L-2-aminodekanylovou skupinu, L-cyklohexylalanylovou skupinu nebo L-tercbutylserylovou skupinu, a
- Y L-prolylovou skupinu, nebo
- X L-histidylovou skupinu a
- Y L-homoprolylovou skupinu nebo D-pipekolinovou skupinu a
- A vodíkový atom nebo alkylovou skupinu s 1 až 10 uhlíkovými atomy nebo dimethylamino-skupinou substituovanou alkylovou skupinu s 1 až 3 uhlíkovými atomy v alkylové části,

když ale substituent X značí L-leucylovou skupinu, potom A naznačí vodíkový atom, jakož i komplexů uvedených sloučenin.

Nové tripeptidové deriváty odpovídající výše uvedenému obecnému vzorci I jsou analogy L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamidu ( $\text{Glp-His-Pro-NH}_2$ ), známého také jako "thyreotropin-releasing hormon" (TRH), ve kterém je ale jedna aminokyselina a sice L-histidylová skupina stojící na druhém místě řetězce, nebo na třetím místě řetězce stojící L-prolylová skupina, nahrazena jinou aminokyselinou, definovanou ve výše uvedeném obecném vzorci I.

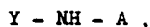
Existence TRH byla známa již od šedesátých let tohoto století, její struktura však byla objasněna teprve v letech 1969 a 1970 prakticky současně, ale navzájem nezávisle, výzkumnými skupinami R. Guillemina a A. Schally (Bowers C.Y. a kol., *Endocrinology* **86**, 1143 /1970/; R. Burgus a kol., *C. R. Acad. Sci., Paris*, **269**, 1870 /1969/).

Tripeptid TRH byl původně popsán jako regulační faktor uvolňování thyreotropního hormonu (TSH) v hypofýze savců; výzkum zabývající se tímto hormonem se však dal novým směrem, neboť se zjistilo, že biologická funkce tohoto tripeptidu není omezena pouze na uvolňování thyreotropního hormonu, nýbrž spočívá také v působení na centrální nervový systém (viz M. P. Plotnikoff a kol., *Science* **178**, 417 /1972/; A. J. Prange a kol., *Lancet* **2**, 999 /1972/). Bylo totiž zjištěno, že TRH vedle funkce hormonové způsobuje také podstatné zkrácení doby spánku způsobeného barbituráty nebo alkoholem, dále také redukuje hypothermii způsobenou různými léčivými prostředky a zvyšuje lokomotorickou aktivitu. Další důležitý faktor působení TRH na centrální nervový systém je potlačování katalepsie způsobené Haloperidolem. Jeví se tedy jako žádoucí, vyrobit pro terapeutickou praxi takové analogy TRH, která působí na hypofýzu pouze slabě a naproti tomu by mělo být působení na centrální nervový systém stejné jako u TRH, nebo ještě vyšší. Za tímto účelem byly vyrobeny sloučeniny podle DE-OS č. 2 343 035, DE-OS č. 2 343 037, DE-OS č. 2 449 167, DE-OS č. 2 514 381, DE-OS č. 2 609 154, DE-OS č. 2 639 393 a BE-PS č. 819 198. Dosavadní výzkum, týkající se tohoto problému a jehož výsledky a postupy jsou zahrnuty v pracích A. J. Prengé a kol. "The role of Hormones in Depression", *Life Sciences* **20**, 1305 /1977/ a A. V. Schally a kol., "Hypothalamic Regulatory Hormones", *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 89 /1978/, nevedl ale ze všech hledisek k uspokojivým výsledkům, které by vedly k uspokojení potřeb terapeutické praxe.

Nyní bylo zjištěno, že se systematickou výměnou některých aminokyselin z aminokyselin, které tvoří molekulu TRH, může dosáhnout toho, že hormonové působení tripeptidu se zcela odstraní nebo alespoň podstatně zredukuje, přičemž účinek na centrální nervový systém zůstane stejný, nebo se dokonce podstatně zvýší.

Jako obzvláště výhodné se jeví takové deriváty, ve kterých je namísto L-histidylvé skupiny v poloze 2 alifatická aminosylová skupina s přímým nebo rozvětveným řetězcem. Takové analogy TRH vykazují při prakticky úplném potlačení hormonového působení účinek, který mnohokrát převyšuje účinek TRH na centrální nervový systém. Výhodná jsou dále také analogy TRH, ve kterých zůstává L-histidylvé skupina v poloze 2 nezměněna, v poloze 3 je však L-prolylová skupina TRH zaměněna za L-homoprolylovou skupinu nebo za D-pipecylovou skupinu.

Při výrobě nových tripeptidamidů obecného vzorce I, se podle vynálezu vychází z amidu aminosyloviny substituované na místě Y aminosylovinou skupinou požadovanou v konečném produktu, obecného vzorce



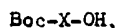
ve kterém má Y a A význam uvedený výše u sloučeniny obecného vzorce I, z toho amidu se potom postupně syntetizuje pomocí metod běžných v chemii peptidů nejprve L-aminosylovina požadovaná pro substituent X v konečném produktu a nakonec L-pyroglytamylová skupina ležící v poloze 1 konečného produktu. Potom se popřípadě odštěpí při uvažované kopulační reakci používané ochranné skupiny.

Výše uvedeným způsobem vyrobené tripeptidamidy obecného vzorce I se mohou z reakční směsi izolovat krystalizací nebo lyofilizací; pokud je to žádoucí, mohou se získané produkty běžnými způsoby převést na komplexy.

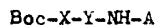
Při stupňovitě probíhající výstavbě tripeptidové molekuly se výhodně nechají reagovat výchozí sloučeniny obecného vzorce



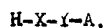
ve kterém mají Y a A výše uvedený význam, v přebytku s aktivovaným derivátem, výhodně s pentafluorfenylesterem nebo popřípadě se smíšeným anhydridem chráněné aminosyloviny obecného vzorce



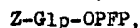
ve kterém má X výše uvedený význam. Při použití pentafluorfenylesteru se získají odpovídající chráněné dipeptidové deriváty obecného vzorce



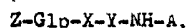
ve kterém mají X, Y a A výše uvedený význam, v podstatně kratší reakční době, totiž v průběhu několika minut, přičemž produkt se může izolovat velmi lehce a většinou ve formě, která nevyžaduje dalšího čištění. Z tímto způsobem získaných, chráněných dipeptidových derivátů se mohou získat pomocí acidolýsy odpovídající a na své koncové skupině volné dipeptidy obecného vzorce.



ve kterém mají X, Y a A výše uvedený význam; tyto se nechají reagovat s L-pyroglytamylovou kyselinou, chráněnou pentafluorfenylesterem, obecného vzorce



ve kterém má Z výše uvedený význam, přičemž se získá chráněný tripeptid obecného vzorce



ve kterém má Z, X, Y a A výše uvedený význam, ze kterého se ochranná skupina Z výhodně odstraní katalytickou hydrogenací.

Čištění získaného konečného produktu se může provádět jednoduchou krystalizací nebo vysrážením, pokud je to nutné, může se také použít chromatografie na sloupci. Konečný produkt se může popřípadě po odstranění vedlejších produktů také vypreparovat jednoduchou lyofilizací.

Tripeptidové deriváty obecného vzorce I, vyrobené podle vynálezu se zkoušejí podle dále popsaných biologických metod na svůj farmakologický účinek.

1. Potlačení haloperidolové katalepsie u krys (viz J. Delay a P. Deniker: Compt. Rend. Cong. Med. Alenistes Neurologistes, 19, 497, Luxemburg 1952).

40 mg/kg Haloperidolu, což je 4-(p-chlorfenyl)-1-(3-(p-fluorbenzoyl)propyl)-piperidin-4-ol se aplikuje zvířatům podkožně a po uplynutí 120 minut se kontroluje nástup katalepsie. Potom se krysy rozdělí do skupin vždy po 10 kusech a intravenózně se jim podává dávka TRH, popřípadě dávka nových analogů TRH podle výsledku. Zvířatům kontrolní skupiny se podává fyziologický roztok chloridu sodného. V intervalu 15, 30, 90 a 120 minut po podání se zkouší účinek jednotlivých sloučenin, snižující katalepsii. Jako kataleptická jsou posuzována ta zvířata, která, když jsou se jejich přední nohy dají na 7 cm vysoký sloupek, nezmění během 30 sekund svoji polohu.

Z počtu zvířat, která nevykazují katalepsii, se zjistí pro jednotlivé účinné látky pomocí probit-analýzy odpovídající hodnoty ED-50. Uvedené pokusy se provádějí se samci krys o celkové hmotnosti 160 až 180 g.

2. Stupňování lokomotorické aktivity u myši, způsobené L-Dopa (viz The Thyroid Axis, Druga nad Behavior, str. 116, A. J. Praga Jr., Raven Press, New York, 1974).

Zvířatům se nejprve intraperitoneálně podá 40 mg/kg N-methyl-N-propargylbenzylaminu (Pargylin), potom 20 mg/kg TRH, popřípadě stejná dávka zkoušených nových tripeptidamidů podle výsledku a nakonec 100 mg/kg L-Dopa. Vždy po 30, 60 a 90 minutách po výše uvedeném zpracování se měří lokomotorická aktivita pokusných zvířat. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce udané v procentech, ve vztahu ke zvířatům zpracovaných TRH. K tomuto pokusu se použije vždy 15 myších samců o celkové hmotnosti vždy 18 až 22 g.

3. Účinek obracející reserpinovou hypothermií u myši (viz B. M. Askew: Life Sci. 2, 725-730/1963/).

Myším samcům o hmotnosti 18 až 22 g rozděleným do skupin po 10 zvířatech, se intraperitoneálně podá 5 mg/kg reserpinu. Po 16 hodinách se těmto zvířatům dále podá TRH v dávce 20 mg/kg, popřípadě stejné množství nových tripeptidamidů podle výsledku.

Rektální teplota zvířat se měří před aplikací reserpinu (v následující tabulce označeno "norm"), po 16 hodinách po aplikaci reserpinu (v následující tabulce označeno "res") a po jedné, popřípadě po dvou hodinách po podání zkoumaného tripeptidamidu (v tabulce označeno "po zpr."). V této tabulce jsou uváděny průměrné teploty naměřené u všech deseti myší.

4. Ovlivnění doby spánku způsobeného hexobarbitalem.

Myším samcům, rozděleným do skupin po 10 zvířatech se intravenózně podá vždy 60 mg/kg hexobarbitalu-Na. Po 10 minutách se myším podá dávka vždy 20 mg/kg TRH, popřípadě zkoumaných tripeptidamidů podle výsledku, což se provede intraperitoneálně. V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty doby spánku takto ošetřených zvířat, vztaženo na dobu spánku zvířat kontrolní skupiny (vždy průměrná hodnota pro 10 zvířat).

Ethanolová narkóza (viz J. M. Cott a kol.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 196, 594/1976/).

Myším CFLP (LATI) obou pohlaví, rozděleným do skupin po dvaceti zvířatech o hmotnosti 18 až 22 g se intraperitoneálně podá vždy 4,5 g ethylalkoholu. Po 10 minutách se potom zvířatům podá dávka vždy 20 mg/kg zkoumaného tripeptidamidu podle výsledku intraperitoneálně. V následující tabulce jsou uvedeny doby spánku takto ošetřených zvířat, vztaženo na dobu spánku zvířat kontrolní skupiny (vždy průměrná hodnota pro 20 zvířat).

6. Hormonová aktivita (účinek TSH u krys).

Krysy samci o hmotnosti asi 200 g se rozdělí do skupin po 7 až 8 kusech a intravenózně se jim aplikuje vždy 20 mg/kg TRH, popřípadě zkoumaného tripeptidu; 15 minut po aplikaci

se zjišťuje TSH-reakce u zvířat radioimunologicky z plazmy. Relativní výšky účinku se spočítají podle čtyřbodové metody za pomoci počítače, přičemž výška účinku TRH se uvažuje jako 100.

Biologické účinky důležitějších sloučenin obecného vzorce I, zjištěné výše popsanými farmakologickými metodami, jsou zahrnuty v následující tabulce.

T a b u l k a

| Glp-X-Y-NH-A |      |    | Potlačení haloperidolové<br>katalepsie | Stupňování lokomoto-<br>rické aktivity L-Dopa | THS-účinek |     |     |      |
|--------------|------|----|----------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|-----|-----|------|
| X            | Y    | A  | ED <sub>50</sub><br>(mg/kg)            | do<br>ba<br>(min)                             | v % po     |     |     |      |
|              |      |    |                                        |                                               | 30'        | 60' | 90' |      |
| Nva          | Pro  | H  | 11,4                                   | 120                                           | 254        | 156 | 214 | 0    |
| Nleu         | Pro  | H  | 16,8                                   | 120                                           | 249        | 105 | 112 | 3,8  |
| Leu          | Pro  | Et | 56,6                                   | 30                                            | 102        | 90  | 201 | 0    |
| His          | HPro | H  | 13,7                                   | 120                                           | 209        | 85  | 110 | 68,6 |
| Abu          | Pro  | H  | 80                                     | 15                                            | 27         | 14  | 18  | 0,02 |
| TRH          |      |    | 80                                     | 15                                            | 100        | 100 | 100 | 100  |

T a b u l k a (pokračování)

| Glp-X-Y-NH-A |      |    | Obrácení reserpinové hypothermie<br>rektální teplota °C |      |                  |      | doba spánku           |                  |
|--------------|------|----|---------------------------------------------------------|------|------------------|------|-----------------------|------------------|
| X            | Y    | A  | norm.                                                   | res. | po zprac.<br>1 h | 2 h  | po hexobarbitalu<br>% | po ethanolu<br>% |
| Nva          | Pro  | H  | 36,2                                                    | 25,9 | 36,4             | 32,0 | 114                   | 77               |
| Ileu         | Pro  | H  | 36,3                                                    | 27,1 | 37,6             | 32,0 | 77                    | 74               |
| Leu          | Pro  | Et | 36,2                                                    | 28,7 | 30,7             | 33,4 | 126                   | 65               |
| His          | HPro | H  | 36,5                                                    | 28,5 | 35,3             | 35,4 | 63                    | 114              |
| Abu          | Pro  | H  | 36,3                                                    | 19,7 | 22,2             | 25,4 | 84                    | 39               |
| TRH          |      |    | 36,2                                                    | 25,9 | 35,5             | 30,2 | 56                    | 35               |

Doba hexobarbitalového spánku ( $\bar{X} \pm SE$ ) :  $38,4 \pm 1,36$  min. Doba ethanolového spánku ( $\bar{X} \pm SE$ ) :  $46,9 \pm 2,17$  min.

Z údajů uvedených v tabulce je zřejmé, že výměnou histidinu za alifatickou aminokyselinu s přímým nebo rozvětveným uhlovodíkovým řetězcem v molekule TRH, nastává zánik nebo minimálně podstatná redukce vylučování thyreotropního hormonu, přičemž například potlačení katalepsie způsobené Haloperidolem je 2 až 7krát silnější. Některá nová analoga TRH podle výsledku vykazují rovněž značné potencování lokomotorické aktivity, popřípadě redukování spánku způsobeného hexobarbitalem nebo ethylalkoholem. Je také pozoruhodné, že nová analoga TRH, která obsahují histidin, vykazují sice asi 70 % hormonového působení, současně však mají značné účinky na centrální nervový systém.

Nové tripeptidy, jakož i jejich farmaceuticky použitelné soli, popřípadě komplexy, vyrobené způsobem podle vynálezu, se mohou používat v terapii ve formě běžných farmaceutických preparátů. Tyto farmaceutické preparáty obsahují účinné látky podle vynálezu ve společnosti

s anorganickými nebo organickými nosnými substancemi, vhodnými pro parenterální nebo enterální aplikaci. Farmaceutické preparáty se mohou připravit například ve formě pevných lyofilisátů, u kterých se mohou použít jako nosné substance s peptidy nereagující sloučeniny, například uhlohydráty. Tyto preparáty se však mohou připravovat také ve formě koncentrovaných nebo zředěných suspenzí nebo emulzí, ve formě tablet, nebo injekčních preparátů.

Praktické provedení způsobu podle vynálezu, popřípadě chemická výroba nových analog TRH podle vynálezu, je blíže objasněna v následujících příkladech provedení. V těchto příkladech používané zkratky odpovídají běžným konvenčním zkratkám používaným v chemii peptidů (viz J. Biol. Chem. 247, 977 /1972/). V následujících příkladech se používají ještě další zkratky :

Ada kyselina L-2-aminodekanová  
Abu kyselina L-2-aminomáselná  
Cha L-cyklohexylalanin  
Pip kyselina L-pipekolinová  
HPro L-homoprolin  
DAE 2-dimethylaminoethyl-  
DCC dicyklohexylkarbodiimid  
PFPOH pentafluorfenol  
DCU dicyklohexylmočovina  
DMFA dimethylformamid

Teploty tání jednotlivých sloučenin, uváděné v jednotlivých příkladech provedení, byly určovány pomocí přístroje pro měření bodů tání podle dr. Tottoliho. Hodnoty optické otáčivosti byly určovány na polarimetru. Při měření pomocí chromatografie na tenké vrstvě se používaly k pokusům destičky silikagelu G podle Stahla. K vyvíjení chromatogramů se používají následující směsi rozpouštědel :

- (1) chloroform : methylelalkohol 9 : 1
- (2) ethylester kyseliny octové : (pyridin : kyselina octová : voda) 9 : 1  
20 : 6 : 11
- (3) ethylester kyseliny octové : (pyridin : kyselina octová : voda) 8 : 2  
20 : 6 : 11
- (4) ethylester kyseliny octové : (pyridin : kyselina octová : voda) 3 : 2  
20 : 6 : 11

K vyvíjení skvrn se používá roztok ninhydrinu, přičemž po postříkání se destičky suší po dobu asi 5 minut při teplotě 105 °C . Potom se chromatogramy uloží do prostředí s obsahem chloru a po vyvětrání se vyvíjejí roztokem o-tolidinkaliumjodidu.

Pro čištění za pomoci chromatografie na sloupci se používá silikagel G o velikosti částic 0,062 až 0,2 mm.

Pro odpařování roztoků ve vakuu se používá rotační vakuová odparka, přičemž odpařování se provádí při teplotách nepřesahujících 50 °C.

Pentafluorfenylester aminokyselin, chráněných BOC, se připraví pomocí metody L. Kisfaludy a kol., Ann. 1973, 1421.

Bližší podrobnosti výroby nových analog TRH podle vynálezu, jsou patrné z následujících příkladů provedení.

## Příklad 1

## L-pyroglyutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

## stupeň 1

## hydrochlorid L-norleucyl-L-prolinamidu

2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 3,97 g (10 mmol) BOC-Nle-OPFP (viz Kisfaludy a kol. Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chemie 359, 887 /1978/) se rozpustí ve 40 ml dimethylformamidu a po 5 minutách stání se tento roztok ve vakuu odpaří. Jako zbytek získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml chloroformu a takto získaný roztok se nejprve třikrát protřepe vždy 10 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec 10 ml vody. Nakonec se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5 ml ethylesteru kyseliny octové a získaný roztok se smísí s 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po 30 minutách stání se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší pomocí bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 2,48 g H-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 94 % teoretického výtěžku, vztaženého na BOC-Nle-OPFP;  $R_f(4) = 0,20$ .

## Stupeň 2

## benzyloxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

1,05 g (4 mmol) H-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl se rozpustí v 10 ml dimethylformamidu a získaný roztok se za míchání a chlazení ledem smísí s 0,56 ml (mmol) triethylaminu a 1,89 g (4,4 mmol) Z-Glp-OPFP. Po pětiminutovém míchání se přidá dalších 0,56 ml (4 mmol) triethylaminu, načež se reakční směs míchá po dobu dalších 20 minut a nakonec se ve vakuu odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 40 ml chloroformu a získaný roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 10 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 10 ml vody. Potom se tento roztok vysuší bezvodým síranem sodným a ve vakuu se odpaří. Jako zbytek získaná olejovitá kapalina se pomocí diethyletheru přivede ke krystalizaci a takto získaný surový produkt (1,52 g) se překrystalizuje z 8 ml ethylesteru kyseliny octové. Tímto způsobem se získá 1,36 g Z-Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 72 % teorie.

T. t. = 146 až 148 °C;

$R_f(3) = 0,32$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -79,8^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

analýza pro C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekulová hmotnost 472,55):

vypočteno : C 61,00 % H 6,85 % N 11,86 %

zjištěno : C 60,90 % H 7,04 % N 11,87 %.

## Stupeň 3

## L-pyroglyutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

1,16 g (2,46 mmol) Z-Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 25 ml methylelalkoholu a tento roztok se smísí s 0,2 g 10 % paládiového katalyzátoru na aktivním uhlí. Potom se do této reakční směsi zavádí po dobu 30 minut plynný vodík, po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Pevný amorfní zbytek se rozetře diethyletherem a odfiltruje. Tímto způsobem získaný surový produkt (0,72 g) se rozpustí ve vodě, roztok se vyčesí pomocí aktivního uhlí a čirý roztok se lyofilisuje. Takto se získá 0,66 g Glp-Nle-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 79,5 % teorie.

$R_f(4) = 0,43$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -77,1^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza aminokyselin : Glu 0,96 (1,0), Nle

1,00 (1,0), Pro 1,00 (1,00).

## P ř í k l a d 2

## L-pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

## Stupeň 1

## L-norvalyl-L-prolinamidhydrochlorid

2,2 g (20 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 3,83 g (10 mmol) BOC-Nva-OPFP (viz L. Kisfaludy a kol., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 395, 887 /1978/) se rozpustí ve 40 ml dimethylformamidu, vzniklý roztok se nechá stát po dobu 5 minut a potom se ve vakuu odpaří. Jako zbytek získá olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 10 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 10 ml vody a konečně se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5 ml ethylesteru kyseliny octové a tento roztok se smísí s 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po třicetiminutovém stání se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 1,83 g H-Nva-Pro-NH<sub>2</sub> · HCl, což odpovídá 73 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Nva-OPFP;  $R_f^{(4)} = 0,10$ .

## Stupeň 2

## Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

1,25 g (5 mmol) H-Nva-Pro-NH<sub>2</sub> · HCl se rozmíchá v 15 ml dimethylformamidu a tato směs se za chlazení ledem a za míchání smísí s 0,7 ml (5 mmol) triethylaminu a 2,15 g (5 mmol) Z-Glp-OPFP. Po pěti minutách se do reakční směsi přidá dalších 0,7 ml (5 mmol) triethylaminu, reakční směs se dalších 20 minut míchá a potom se ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 50 ml chloroformu, tento roztok se vytřepe nejprve třikrát vždy 10 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a konečně jednou 10 ml vody, potom se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek získaná olejovitá kapalina se pomocí diethyletheru přivede ke krystalizaci a tímto způsobem získaný produkt surový (1,80 g) se překrystalizuje ze směsi ethylalkoholu diethyletheru. Tímto způsobem se získá 1,66 g Z-Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 72 % teoretického výtěžku.

T. t. = 166 až 167 °C;

$R_f^{(3)} = 0,29$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -87,5^\circ$  ( $c = 1$ , kyselina octová);

analýza pro C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekulová hmotnost 458,52):

vypočteno: C 60,25 % H 6,59 % N 12,22 %

zjištěno: C 60,08 % H 6,70 % N 12,15 %.

## Stupeň 3

## L-pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

1,42 g (3,1 mmol) Z-Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 30 ml methylalkoholu, tento roztok se smísí s 0,2 g 10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu 30 minut zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Pevný amorfni zbytek se rozetře s diethyletherem a oddělí. Tímto způsobem získaný surový produkt se rozpustí ve vodě, roztok se vyčeří pomocí aktivního uhlí, toto se potom odfiltruje a čirý roztok se lyofilisuje. Získá se takto 0,95 g Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 94 % teoretického výtěžku.

$R_f^{(4)} = 0,36$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -87,0^\circ$  ( $c = 1$ , kyselina octová);

Analýza pro  $C_{23}H_{30}O_6N_4$  (molekulová hmotnost 458,52):

vypočteno : C 60,25 % H 6,59 % N 12,22 %

zjištěno : C 60,08 % H 6,70 % N 12,15 %.

Stupeň 3

L-pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

1,42 g (3,1 mmol) Z-Glp-Nva-Pro-NH<sub>2</sub> s rozpustí ve 30 ml methylalkoholu, tento roztok se smísí s 0,2 g 10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu 30 minut zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Pevný amorfni zbytek se rozetře s diethyletherem a oddělí. Tímto způsobem získaný surový produkt se rozpustí ve vodě, roztok se vyčechí pomocí aktivního uhlí, toto se potom odfiltruje a čirý roztok se lyofilisuje. Získá se takto 0,95 g Glp-Nva-Pro-MH<sub>2</sub>, což odpovídá 94 % teoretického výtěžku.

$R_F(4) = 0,36;$

$[\alpha]_D^{25} = -87,0^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza aminokyselin : Glu 0,97 (1,0), Nva 1,09  
(1,0), Pro 1,00 (1,0).

P ř í k l a d 3

L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

Stupeň 1

L-prolyl-L-prolinamidhydrochlorid

2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 3,81 g (10 mmol) BOC-Pro-OPFP se rozpustí ve 40 ml dimethylformamidu, získaný roztok se protřepe nejprve třikrát 10 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhlíčitaneu sodného a nakonec jednou 10 ml vody, načež se tento roztok vysuší za pomoci bezvodého síranu sodného odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5 ml ethylesteru kyseliny octové a smísí se s 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po 30 minutách se tato reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a vysuší se ve vakuu za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 2,06 g H-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL, což odpovídá 83 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Pro-OPFP;

$R_F(4) = 0,05.$

Stupeň 2

Benzylloxylarbyl-L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

0,75 g (3 mmol) H-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL se rozmíchá v 10 ml dimethylformamidu a za chlazení ledem a za míchání se smíchá s 0,42 ml (3 mmol) triethylaminu a 1,35 g (3,15 mmol) Z-Glp-OPFP. Po 5 minutách se k reakční směsi přidá dalších 0,42 ml (3 mmol) triethylaminu a po dalších deseti minutách míchání se vzniklá hustá suspenze ve vakuu odpaří. Krystalický zbytek po odpaření se rozetře s 8 ml diethyletheru a tato směs se nechá stát po dobu 3 hodin v ledničce. Získaná sraženina se potom odfiltruje a vysuší. Tímto způsobem se získá 1,0 g Z-Glp-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 73 % teoretického výtěžku.

T. t. = 247 až 248 °C (rozklad);

$R_F(3) = 0,19;$

$[\alpha]_D^{25} = -82,8^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza pro  $C_{23}H_{28}O_6N_4$  (molekulová hmotnost 456,50):

vypočteno : C 60,52 % H 6,18 % N 12,27 %

zjištěno : C 60,03 % H 6,20 % N 12,20 %.

## L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

1,0 g (2,2 mmol) Z-Glp-Pro-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí v 50 ml kyseliny octové, k tomuto roztoku se přidá 0,2 g 10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu jedné hodiny zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem získaný amoční surový produkt (0,60 g) se rozpustí ve vodě, roztok se vyčechá za pomoci aktivního uhlí a po odfiltrování aktivního uhlí se čirý roztok lyofilisuje. Získá se takto 0,50 g Glp-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 70 % teoretického výtěžku.

$$R_f(4) = 0,10;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -223,1^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová}),$$

P ř í k l a d 4

## L-pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

Stupeň 1

## L-valyl-L-prolinamidhydrochlorid

0,49 g (4,2 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 0,82 g (2,14 mmol) BOC-Val-OPFP se rozpustí v 10 ml dimethylformamidu a po třicetiminutovém stání se roztok ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 10 ml chloroformu a získaný roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 3 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 3 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitenu sodného a nakonec jednou 3 ml vody. Potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 3 ml ethylesteru kyseliny octové a tento roztok se smísí se 3 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po jedné hodině stání se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se suší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 0,51 g H-Val-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 95 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Val-OPFP;

$$R_f(4) = 0,10.$$

Stupeň 2

## Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

0,38 g (1,52 mmol) H-Val-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl se rozmíchá v 10 ml dimethylformamidu a za chlazení ledem a za míchání se smísí s 0,22 ml (1,52 mmol) triethylaminu a s 0,69 g (1,6 mmol) Z-Glp-OPFP. Po 10 minutách se do reakční směsi přidá dalších 0,22 ml (1,52 mmol) triethylaminu a po dalších 30 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 15 ml chloroformu a získaný roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 5 ml 1N roztoku vodné kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 5 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitenu sodného a konečně jednou 5 ml vody. Potom se reakční roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a ve vakuu se odpaří. Po odpaření zbylá olejovitá kapalina se za pomoci diethyletheru přivede ke krystalizaci. Tímto způsobem se získá 0,54 g Z-Glp-Val-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 77 % teoretického výtěžku.

$$T. t. = 116 \text{ až } 118^\circ \text{C};$$

$$R_f(3) = 0,30;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -100,5^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová}).$$

Stupeň 3

## L-pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

9,65 g (21,2 mmol) Z-Glp-Val-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 300 ml vody a po přidavku 2 g

10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí se po dobu 5 hodin zavádí do reakčního roztoku plyný vodík. Katalyzátor se potom odfiltruje a filtrát se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v ethylalkoholu, roztok se odpaří a tato operace se opakuje ještě dvakrát. Nakonec získaný amorfni pevný zbytek se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem se získá 4,47 g Glp-Val-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 65 % teoretického výtěžku.

$$R_F^{(4)} = 0,34;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -104,9^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová})$$

Analýza aminokyselin: Glu 1,03 (1,01), Val 1,00 (1,0), Pro 0,94 (1,0).

#### Příklad 5

L-pyroglutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

##### Stupeň 1

Benzyloxykarbonyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

51,4 g (0,1 mmol) Z-Ile-OPFP a 12,5 g (0,11 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 250 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí se 14,0 ml (0,1 mmol) triethylaminu. Reakční směs se nechá přes noc stát a příští den se ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 500 ml chloroformu a tento roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 100 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž dvakrát 100 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a konečně jednou 100 ml vody, potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a nakonec se odpaří. Olejovitý zbytek se pomocí směsi 100 ml diethyletheru a 100 ml n-hexanu přivede ke krystalizaci. Tímto způsobem získaný surový produkt (31,7 g) se překrystalizuje ze směsi 60 ml ethylesteru kyseliny octové a 60 ml n-hexanu. Získá se 30,32 g Z-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>, což představuje 84 % teoretického výtěžku.

T. t. = 127 až 128 °C;

$$R_F^{(2)} = 0,54.$$

##### Stupeň 2

L-isoleucyl-L-prolinamid-hydrochlorid

24,0 g (66,5 mmol) Z-Ile-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 470 ml methylalkoholu, přidá se 30 ml 2,4N methylalkoholového roztoku kyseliny chlorovodíkové a 4 g 10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do této reakční směsi se po dobu jedné hodiny zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem a tímto způsobem získaný surový produkt (20 g) se překrystalizuje ze směsi methylalkoholu a diethyletheru. Získá se takto 16,05 g H-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl, což představuje 81 % teoretického výtěžku.

T. t. = 135 až 140 °C;

$$R_F^{(4)} = 0,15.$$

##### Stupeň 3

Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

0,90 g (3,5 mmol) H-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl se rozmíchá ve 20 ml dimethylformamidu a za chlazení ledem a za míchání se tato směs smísí s 0,49 ml (3,5 mmol) triethylaminu a s 1,57 g (3,7 mmol) Z-Glp-OPFP. Po uplynutí pěti minut se přidá dalších 0,49 ml (3,5 mmol) triethylaminu a po dalších 20 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 30 ml chloroformu a tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 7 ml

1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 7 ml vody. Tento roztok se potom vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se několikrát zpracuje diethyletherem a diethylether se oddekantuje; nakonec se surový produkt přivede pomocí diethyletheru ke krystalizaci, krystaly se oddělí, rozpustí se v ethylesteru kyseliny octové a přidavkem diethyletheru se opět vysráží. Tímto způsobem se získá 1,18 g Z-Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>, což představuje 71,2 % teoretického výtěžku.

T. t. = 87 až 89 °C;

$R_F^{(3)} = 0,36$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -91,4^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza pro C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (molekulová hmotnost 427,55):

vypočteno: C 61,00 % H 6,83 % N 11,6 %

zjištěno: C 59,19 % H 6,88 % N 11,16 %.

Stupeň 4

L-pyroglyutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

4,72 g (10 mmol) Z-Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 100 ml methylethanolu, k roztoku se přidá 1 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu jedné hodiny se do reakční směsi zavádí plynný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem získaný surový produkt (3,22 g) se rozpustí ve vodě a roztok se vyčechá pomocí aktivního uhlí. Po odfiltrování aktivního uhlí se čirý roztok lyofilisuje a získá se 3,03 g Glp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 98 % teoretického výtěžku.

$R_F^{(4)} = 0,45$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -100,7^\circ$  (c = 1, kyselina octová),

Analýza aminokyselin: Glu 0,95 (1,0), Ile 1,00 (1,0), Pro 1,02 (1,0).

Příklad 6

L-pyroglyutamyl-L-alfa-aminobutyryl-L-prolinamid

Stupeň 1

pentafluorfenylester kyseliny tetrabutylloxykarbonyl-L-alfa-aminomáselné

7,7 g (20 mmol) BOC-Abá-OH. DCH se rozmíchá v 60 ml diethyletheru, do této směsi se přidá 20 ml 2N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a reakční směs se třepá až do rozpustění suspendované substance. Diethyletherová fáze se potom, vytřepe se 20 ml 2N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a potom 20 ml vody, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina (4,14 g) a 3,7 g (20 mmol) PFPOH se rozpustí ve 25 ml ethylesteru kyseliny octové, roztok se ochladí pod teplotu 5 °C a za míchání se do něj přidá 3,92 g (19 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu. Tato reakční směs se míchá po dobu jedné hodiny na ledové lázni, potom se odfiltruje dicyklohexylmočovina a filtrát se odpaří. Jako zbytek získaná olejovitá kapalina se rozpustí v n-hexanu a získaný roztok se nechá stát po dobu jedné hodiny v ledničce. Ještě vyloučená dicyklohexylmočovina se znovu odfiltruje filtrát se zahustí na objem 20 ml. Po počátku vylučování krystalů se suspenze uloží do ledničky a nechá se tam stát přes noc. Příští den se vyloučené krystaly oddělí filtrací a získá se 5,57 g BOC-Abu-OPFP, což odpovídá 76 % teoretického výtěžku.

T. t. = 83 až 84 °C;

$R_F^{(1)} = 0,86$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -32,8^\circ$  (c = 1, ethylester kyseliny octové);

Analýza pro  $C_{15}H_{16}O_4NF_5$  (mol. hmotnost 369,29):

vypočteno: C 48,79 % H 4,37 % N 3,79 % F 25,72 %

zjištěno: C 48,55 % H 4,28 % N 3,70 % F 25,44 %.

#### Stupeň 2

L-alfa-aminobutyryl-L-prolinamidhydrochlorid

3,2 g (28 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 5,16 g (14 mmol) BOC-Abu-OPFP se rozpustí v 60 ml dimethylformamidu a po pětiminutovém stání se vzniklý roztok ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 100 ml chloroformu a tento roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 20 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a potom dvakrát rovněž 20 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhlíčitánu sodného. Potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 20 ml ethylesteru kyseliny octové a roztok se smísí s 20 ml 6N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po uplynutí jedné hodiny se reakční směs zředí diethyletherem, získaná sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem získaný surový produkt (3,86 g) se rozetře s 20 ml studeného dimethylformamidu a tímto způsobem se získá 2,40 g H-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL; což odpovídá 75 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Abu-OPFP;

$$R_F^{(4)} = 0,10.$$

#### Stupeň 3

Benzyl oxykarbonyl-L-pyroglutamyl-alfa-aminobutyryl-L-prolinamid

2,13 g (9 mmol) H-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL se rozmíchá ve 30 ml dimethylformamidu a za chlazení ledem a za míchání se k této směsi přidá 1,26 ml (6 mmol) triethylaminu a 3,95 g (9,2 mmol) Z-Glp-OPFP. Po uplynutí 5 minut se k reakční směsi přidá dalších 1,26 ml (9 mmol) triethylaminu a po 20 minutách dalšího míchání reakční směsi se tato ve vakuu odpaří. Krystalický zbytek získaný po odpaření se rozetře s 20 ml ethylalkoholu, nechá se stát přes noc v lednici a potom se odfiltruje. Tímto způsobem se získá 3,30 g Z-Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 82 % teoretického výtěžku.

T. t. = 175 až 176 °C;

$$R_F^{(3)} = 0,28;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -99,6^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová}).$$

#### Stupeň 4

L-pyroglutamyl-L-alfa-aminobutyryl-L-prolinamid

2,67 g (6 mmol) Z-Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 100 ml kyseliny octové, k získanému roztoku se přidá 0,5 g 10 % paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu jedné hodiny zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem získaný amorfni surový produkt (1,82 g) se rozpustí ve vodě, roztok se vyčerpá pomocí aktivního uhlí a po odfiltrování aktivního uhlí se čirý roztok lyofilisuje. Získá se takto 1,70 g Glp-Abu-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 91 % teoretického výtěžku.

$$[\alpha]_D^{25} = -102,5^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová}).$$

## L-pyroglyutamyl-L-alfa-aminodekanoyl-L-prolinamid

## Stupeň 1

## L-alfa-aminodekanoyl-L-prolinamidhydrochlorid

1,37 g (12 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 2,72 g (16 mmol) BOC-Ada-OPFP se rozpustí ve 20 ml dimethylformamidu a po pětiminutovém stání se roztok ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 10 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové ve vodě, potom rovněž třikrát 1N vodným roztokem hydrogenuhlíkitanu sodného a končně dvakrát vždy 10 ml vody, potom se tento roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a nakonec se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 3 ml ethylesteru kyseliny octové a tento roztok se smísí s 5 ml 6N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po jednohodinovém stání se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se za pomoci bezvodého hydroxidu sodného vysuší. Tímto způsobem se získá 1,75 g H-Ada-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl, což odpovídá 91 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Ada-OPFP;

$$R_f^{(3)} = 0,11.$$

## Stupeň 2

## Benzyloxylarbyonyl-L-pyroglyutamyl-L-alfa-aminodekanoyl-L-prolinamid

1,75 g (5,5 mmol) H-Ada-Pro-NH<sub>2</sub>·HCl a 2,58 g (6 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí ve 300 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 0,77 ml (5,5 mmol) triethylaminu. Po uplynutí 5 minut se přidá k reakční směsi dalších 0,77 ml (5,5 mmol) triethylaminu a po dalších 20 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek získaný po odpaření se rozpustí v 50 ml chloroformu, roztok se protřepe třikrát vždy 20 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát 20 ml 1N vodného roztoku hydrogenuhlíkitanu sodného a nakonec dvakrát vždy 20 ml vody, potom se tento roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří se. Jako zbytek po odpaření získaná zpěňná olejovitá kapalina se rozetře s diethyletherem a získaná gelovitá suspenze se nechá stát po dobu 2 hodin v lednici. Po této době se sraženina odfiltruje a vysuší. Tímto způsobem získaný surový produkt (2,61 g) se překrystalizuje z ethylesteru kyseliny octové a získá se 2,45 g Z-Glp-Ada-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 84 % teoretického výtěžku.

$$T. t. = 103 \text{ až } 105^\circ \text{C};$$

$$R_f^{(2)} = 0,19;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -63,7^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová});$$

Analýza pro C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (mol. hmotnost 528,65):

vypočteno: C 63,62 % H 7,63 % N 10,60 %

zjištěno: C 63,24 % H 7,81 % N 10,57 %.

## Stupeň 3

## L-pyroglyutamyl-L-alfa-aminodekanoyl-L-prolinamid

1,9 g (3,6 mmol) Z-Glp-Ada-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 40 ml kyseliny octové, k tomuto roztoku se přidá 0,2 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu jeden a půl hodiny zavádí plynný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozpustí ve vodě. Vodný roztok se vyčerpá pomocí aktivního uhlí a po přefiltrování se čirý roztok odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 30 ml chloroformu, roztok se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Napěněný amorfnní pevný zbytek se rozetře s diethyletherem, odfiltruje a vysuší. Tímto způsobem se získá 1,20 g Glp-Ada-Pro-NH<sub>2</sub>, což představuje 82 % teoretického výtěžku.

$$R_F^{(4)} = 0,55;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -66,2^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová}).$$

## P ř í k l a d 8

L-pyroglutamyl-L-cyklohexylalanin-L-prolinamid

## Stupeň 1

tercbutyloxykarbonyl-L-cyklohexylalanin-pentafluorfenylester

9,04 g (20 mmol) BOC-Cha-OH. DCHA se rozmíchá v 80 ml diethyletheru a vytvořená suspenze se smísí s 20 ml 2N roztoku kyseliny chlorovodíkové ve vodě. Reakční směs se protřepe až do rozpuštění pevné fáze, potom se diethyletherová fáze oddělí, protřepe se nejprve 20 ml 2N vodného roztoku kyseliny sírové a potom 20 ml vody, vysuší se pomocí bezvodého síranu vápenatého a odpaří se. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina (5,7 g) se rozpustí ve 30 ml ethylesteru kyseliny octové, tento roztok se smísí s 3,7 g (20 mmol) PFPOH, směs se ochladí na teplotu maximálně 5°C a potom se smísí se 4,12 g (20 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu. Reakční směs se při této teplotě míchá po dobu jedné hodiny, potom se vyloučená dicyklohexylmočovina odfiltruje, filtrát se odpaří a jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 30 ml n-hexanu. Tento roztok se ponechá stát po dobu jedné hodiny v lednici, při tom vyloučená dicyklohexylmočovina se opět odfiltruje a filtrát se zředí 70 ml n-hexanu. Tento zředěný roztok se protřepe nejprve pětkrát vždy 40 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného ve vodě a potom dvakrát vždy 40 ml vody, potom se tento roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina při stání krystalizuje. Tímto způsobem se získá 8,48 g BOC-Cha-OPFP, což odpovídá 97 % teoretického výtěžku.

T. t. = 75 až 77 °C;

$$R_F = 0,88;$$

Analýza pro  $C_{20}H_{24}O_4NF_5$  (mol. hmotnost 437,41):

vypočteno: C 54,92 % H 6,53 % N 3,20 % F 21,72 %

zjištěno: C 54,67 % H 5,66 % N 3,11 % F 21,43 %.

## Stupeň 2

L-cyklohexylalanin-L-prolinamidhydrochlorid

2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 4,37 g (10 mmol) BOC-Cha-OPFP se rozpustí ve 40 ml dimethylformamidu a po pětiminutovém stání reakčního roztoku se tento ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 80 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 20 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 20 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 20 ml vody, potom se tento roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 8 ml ethylesteru kyseliny octové, smísí se s 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové a po uplynutí jedné hodiny se reakční směs zředí diethyletherem. Při tom vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 2,98 g H-Cha-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL, což odpovídá 97 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Cha-OPFP;

$$R_F^{(4)} = 0,33.$$

## Stupeň 3

Benzoyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-cyklohexyl-alanin-L-prolinamid

2,43 g (8 mmol) H-Cha-Pro-NH<sub>2</sub>. HCL a 3,60 g (8,4 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí ve 25 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 1,12 ml (8 mmol) triethylaminu. Po uplynutí

5 minut se k reakčnímu roztoku přidá dalších 1,12 ml (8 mmol) tricethylaminu a po dalších 20 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí v 80 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 20 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 20 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného ve vodě a konečně jednou 20 ml vody, potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se přivede pomocí diethyletheru ke krystalizaci. Tímto způsobem získaný surový produkt (3,88 g) se překrystalizuje ze 30 ml ethylesteru kyseliny octové a získá se 3,32 g Z-glp-Cha-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 81 % teoretického výtěžku.

T. t. = 165 až 166 °C;

$R_f^{(2)} = 0,17$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -67,3^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza pro C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (mol. hmotnost 512,61):

vypočteno: C 63,26 % H 7,08 % N 10,93 %

zjištěno: C 63,15 % H 7,04 % N 10,91 %.

Stupeň 4

L-pyroglutamyl-L-cyklohexylalaninyl-L-prolinamid

3,07 g (6 mmol) Z-Glp-Cha-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí v 60 ml ethylalkoholu, do tohoto roztoku se přidá 0,6 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu 2 hodin se do reakčního roztoku zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem se získá 2,45 g amorfního, pevného Glp-Cha-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 95 % teoretického výtěžku.

$R_f^{(4)} = 0,50$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -70,9^\circ$  (c = 1, kyselina octová).

P ř í k l a d 9

L-pyroglutamyl-L-threonyl-L-prolinamid

Stupeň 1

O-benzyl-L-threonyl-L-prolinamidhydrochlorid

1,43 g (12,5 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 2,98 g (6,27 mmol) BOC-Thr(Bzl)-OPFP se rozpustí ve 20 ml dimethylformamidu a po pětiminutovém stání se reakční roztok ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 30 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a potom třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného, potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 4 ml ethylesteru kyseliny octové a smísí se s 5 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po jednohodinovém stání reakčního roztoku se tento zředí diethyletherem, při tom vzniklá sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 2,06 g H-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>. HCl, což odpovídá 95 % teoretického výtěžku;

$R_f^{(4)} = 0,40$ .

Stupeň 2

Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-O-benzyl-threonyl-L-prolinamid

2,05 g (6 mmol) H-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>. HCl a 2,69 g (6,27 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí ve 21 ml dimethylformamidu, tento roztok se po kapkách smísí s 0,84 ml (6 mmol) triethyl-

aminu a po pětiminutovém stání reakční směsi se přidá dalších 0,84 ml (6 mmol) triethylaminu. Po dvacetiminutovém míchání této reakční směsi se ve vakuu odpaří a zbytek po odpaření se rozpustí v 50 ml chloroformu. Tento roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného, nakonec se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracuje diethyletherem a ochladí, přičemž produkt ztuhne v amorfním stavu. Tímto způsobem získaný surový produkt (2,76 g) se rozpustí v ethylesteru kyseliny octové a roztok se vyčehří aktivním uhlím. Po odfiltrování aktivního uhlí se filtrát odpaří a zbylý pevný amorfni zčernalý zbytek se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem se získá 2,47 g Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 75 % teoretického výtěžku.

### Stupeň 3

#### L-pyroglyutamyl-L-threonyl-L-prolinamid

2,04 g (3,7 mmol) Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 40 ml kyseliny octové, k tomuto roztoku se přidá 0,4 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu 4 hodin se do reakčního roztoku zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem získaný amorfni surový produkt (1,31 g) se nanese na sloupec obsahující 30 g silikagelu (velikost částic v rozmezí 0,063 až 0,2 mm) a eluuje se směsí rozpouštědel (3). Eluční frakce obsahující čistý produkt se spojí a odpaří a jako zbytek po odpaření získaný surový produkt se zpracuje diethyletherem. Tímto způsobem se získá 0,72 g Glp-Thr-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 59,5 % teoretického výtěžku.

$$R_F^{(4)} = 0,16;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -90,0^\circ \quad (c = 1, \text{ kyselina octová})$$

Analýza aminokyselin: Glu 1,00 (1,00), Thr 0,99 (1,0), Pro 1,03 (1,0)

### P ř í k l a d 10

#### L-pyroglyutamyl-O-tercbutyl-L-seryl-L-prolinamid

### Stupeň 1

#### O-tercbutyl-L-seryl-L-prolinamidhemioxalát

8,0 g (70 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 16,0 g (34,7 mmol) Z-Ser(tBu)-OPFP se rozpustí ve 120 ml dimethylformamidu, načež se roztok po pětiminutovém stání ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 300 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve třikrát vždy 80 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 80 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a konečně jednou rovněž 80 ml vody, tento roztok se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina (18 g) se rozpustí společně se 4,37 g (34,7 mmol) dihydrátu kyseliny šťavelové ve 300 ml methylalkoholu, k tomuto roztoku se přidají 3 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu jedné hodiny zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří, zbytek po odpaření se rozetře s ethylesterem kyseliny octové a ve vakuu se vysuší. Tímto způsobem se získá 10,8 g H-Ser(tBu)-Pro-NH<sub>2</sub>. (COOH)<sub>2</sub> ve formě amorfni hygroskopické substance, což odpovídá 90 % teoretického výtěžku;

$$R_F^{(4)} = 0,22.$$

### Stupeň 2

#### Benzyloxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-O-tercbutyl-L-seryl-L-prolinamid

6,43 g (18,5 mmol) H-Ser(tBu)-Pro-NH<sub>2</sub>. (COOH)<sub>2</sub> a 7,95 g (18,5 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí v 80 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 5,18 ml (37 mmol) triethylaminu. Po pětiminutovém stání se reakční směs ve vakuu odpaří a krystalický zbytek se rozetře s diethyletherem. Tímto způsobem získaný produkt (9,53 g) se potom překrystalizuje ze 120 ml methylalkoholu. Získá se takto 7,70 g Z-Glp-Ser(tBu)-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 83 % teoretického výtěžku.

T. t. = 226 až 229 °C;

$R_f^{(3)} = 0,40$ ;

$[\alpha]_D^{25} = +71,6^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza pro C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub> (mol. hmotnost 502,57):

vypočteno: C 59,75 % H 6,82 % N 11,15 %

zjištěno: C 59,55 % H 6,95 % N 11,09 %.

Stupeň 3

L-pyroglyutamyl-O-terc.butyl-L-seryl-L-pro-linamid

4,02 g (8 mmol) Z-Glp-Ser(tBu)-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 160 ml methylalkoholu, tento roztok se smísí s 0,8 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu 30 minut se do reakční směsi zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje a filtrát se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se krystalizuje z diethyletheru, krystaly se odfiltrují a vysuší. Tímto způsobem se získá 2,50 g Glp-Ser(tBu)-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 85 % teoretického výtěžku.

T. t. = 186 až 187 °C;

$R_f^{(4)} = 0,45$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -60,8^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza aminokyselin: Glu 1,03 (1,0), Ser 1,00  
(1,0), Pro 1,00 (1,0);

Analýza pro C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub> (mol. hmotnost 368,44):

vypočteno: C 55,42 % H 7,66 % N 15,21 %

zjištěno: C 55,07 % H 7,61 % N 14,94 %.

P ř í k l a d 11

L-pyroglyutamyl-D-leucyl-L-prolinamid

Stupeň 1

Terc.butyloxykarbonyl-D-leucin-pentafluor-fenylester

4,62 g (20 mmol) BOC-D-Leu-OH a 4,23 g (22 mmol) PFPOH se rozpustí v 50 ml ethylesteru kyseliny octové a tento roztok se za míchání a ohlazení ledem smísí se 4,12 g (20 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu. Reakční směs se míchá po dobu jedné hodiny v ledové lázni potom se vyloučená dicyklohexylmočovina odfiltruje filtrát po odfiltrování této dicyklohexylmočoviny se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 100 ml n-hexanu, roztok se ponechá stát po dobu jedné hodiny v ledniče a znovu vyloučená dicyklohexylmočovina se opět odfiltruje. Filtrát se protřepe nejprve pětkrát vždy 50 ml 1N roztoku hydrogen uhličitanu sodného ve vodě a potom dvakrát vždy 50 ml vody, potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina přes noc vykřystalizuje. Tímto způsobem se získá 7,0 g BOC-D-Leu-OPFP, což odpovídá 88 % teoretického výtěžku.

T. t. = 53 až 55 °C;

$[\alpha]_D^{25} = +31,7^\circ$  (c = 1, ethylester kyseliny octové);

Analýza pro  $C_{17}H_{20}NF_5$  (mol. hmotnost 397,55):

vypočteno: C 51,39 % H 5,07 % N 3,53 % F 23,91 %

zjištěno: C 51,51 % H 4,68 % N 3,66 % F 23,65 %.

#### Stupeň 2

D-leucyl-L-prolinamidhydrochlorid

3,42 g (30 mmol) H-Pro-NH<sub>2</sub> a 60,0 g (15 mmol) BOC-D-Leu-OPFP se rozpustí v 60 ml dimethylformamidu a po pětiminutovém stání se roztok ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 100 ml chloroformu, tento roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 20 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové ve vodě, potom třikrát 20 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 20 ml vody, roztok se potom vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 10 ml ethylesteru kyseliny octové a k tomuto roztoku se přidá 15 ml 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové. Po jedné hodině se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 3,66 g H-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>. HCl, což odpovídá 92,5 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-D-Leu-OPFP;

$R_f^{(4)} = 0,26$ .

#### Stupeň 3

Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-D-leucyl-L-prolinamid

3,66 g (13,9 mmol) H-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. HCl a 6,43 g (15 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí v 50 ml dimethylformamidu a tento roztok se za chlazení ledem a za míchání smísí s 1,95 ml (13,9 mmol) triethylaminu. Reakční směs se míchá po dobu 5 minut a potom se do ní přidá dalších 1,95 ml (13,9 mmol) triethylaminu. Po dalších 20 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 120 ml chloroformu, roztok se vytřepe nejprve třikrát vždy 30 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 30 ml 1N vodného roztoku hydrogen sodného a nakonec jednou 30 ml vody, tento roztok se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracováním s diethyletherem přivede ke krystalizaci. Tímto způsobem získaný surový produkt (6 g) se překrystalizuje ze 30 ml ethylalkoholu a získá se 5,48 g Z-Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 77 % teoretického výtěžku.

T. t. = 189 až 194 °C;

$R_f^{(3)} = 0,48$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -33,2^\circ$  (c = 1, kyselina octová).

#### Stupeň 4

L-pyroglutamyl-D-leucyl-L-prolinamid

3,78 g (8 mmol) Z-Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub> se rozpustí ve 150 ml methylalkoholu a k tomuto roztoku se přidá 0,8 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí. Do reakční směsi se potom zavádí po dobu jedné hodiny plynný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se zracuje diethyletherem. Tímto způsobem získaný surový produkt (2,5 g) se rozpustí ve vodě, vodný roztok se vyčechí pomocí aktivního uhlí a po odfiltrování aktivního uhlí se čirý filtrát lyofilizuje. Tímto způsobem se získá 2,35 g Glp-D-Leu-Pro-NH<sub>2</sub>, což odpovídá 87 % teoretického výtěžku.

$R_f^{(4)} = 0,48$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -83,3^\circ$  (c = 1, kyselina octová).

## P ř í k l a d 12

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolinethylamid

Stupeň 1

L-leucyl-L-prolin-ethylamidhydrochlorid

1,67 g (7,2 mmol) H-pro-NH-Et. (COOH)<sub>2</sub> se rozmíchá ve 20 ml ethylesteru kyseliny octové a tato suspenze se smísí se 2,0 ml (14,4 mmol) triethylaminu a 2,38 g (6 mmol) BOC-Leu-OPFP. Po ošti minutách se reakční směs protřepe nejprve třikrát vždy 5 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom rovněž třikrát vždy 5 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitánu sodného a nakonec jednou 5 ml vody potom se tento roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracuje 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové, po uplynutí 20 minut se reakční směs zředí diethyletherem, vyloučená sraženina se odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 1,46 hygroskopického H-Leu-Pro-NH-Et. HCl, což odpovídá 83 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Leu-OPFP.

$$R_f^{(4)} = 0,43.$$

Stupeň 2

Benzylloxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolinamid

1,17 g (4 mmol) H-Leu-Pro-NH-Et. HCl a 1,72 g (4 mmol) Z-Glp-OPFP se rozpustí v 5 ml dimethylformamidu a získaný roztok se smísí s 0,56 ml (4 mmol) triethylaminu. Po uplynutí pěti minut se do reakční směsi přidá dalších 0,56 ml (4 mmol) triethylaminu a reakční směs se ve vakuu odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve 40 ml chloroformu, roztok se protřepe nejprve dvakrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitánu sodného a nakonec jednou 10 ml vody, tento roztok se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Zbytek po odpaření se rozetře s n-hexanem a odfiltruje. Tímto způsobem se získá 1,61 g amorfního Z-Glp-Leu-Pro-NH-Et, což odpovídá 80,5 % teoretického výtěžku.

$$R_f^{(3)} = 0,50;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -89,0^\circ \text{ (c = 1, kyselina octová)}.$$

Stupeň 3

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolinethylamid

1,07 g (2,14 mmol) Z-Glp-Leu-Pro-NH-Et se rozpustí ve 30 ml vody, do roztoku se přidá 0,25 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do reakční směsi se po dobu jeden a půl hodiny zavádí plynný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří, olejovitý zbytek se rozpustí ve 20 ml chloroformu, tento roztok se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Po zpění ztuhlý zbytek se rozetře se směsí diethyletheru n-hexanu a tímto způsobem se získá 0,52 g Glp-Leu-Pro-NH-Et, což odpovídá 66 % teoretického výtěžku.

$$R_f^{(4)} = 0,57;$$

$$[\alpha]_D^{25} = -94,5^\circ \text{ (c = 1, kyselina octová)}.$$

## P ř í k l a d 13

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolin-n-decylamid

Stupeň 1

Benzylloxykarbonyl-L-prolin-n-decylamid

5,0 g (20 mmol) Z-Pro-OH se rozpustí v 50 ml dimethylformamidu, k tomuto roztoku se

přidá 2,8 ml (20 mmol) triethylaminu a reakční směs se ochladí na teplotu  $-10^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě se za míchání přidá nejprve po kapkách 2,8 ml (21,5 mmol) izobutylesteru kyseliny chlormravenčí a po 10 minutách se do reakční směsi rovněž po kapkách přidá 4,4 ml (22 mmol) n-decylaminu. Po ukončení přídavku se reakční směs míchá nejprve po dobu 30 minut při teplotě  $0^{\circ}\text{C}$  a potom po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Získaná suspenze se odfiltruje, filtrát se odpaří a zbytek po odpaření se rozpustí ve 100 ml ethylesteru kyseliny octové. Tento roztok se protřepe nejprve pětkrát vždy 50 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom dvakrát vždy 50 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a konečně jednou 50 ml vody, potom se roztok vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se přivede ke krystalizaci zpracováním s n-hexanem. Tímto způsobem se získá 5,43 g Z-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, což odpovídá 70 % teoretického výtěžku.

T. t. = 78 až 80  $^{\circ}\text{C}$ ;

$R_f^{(2)} = 0,75$ .

Stupeň 2

L-prolin-n-decylaminhemioxalát

5,0 g (12,9 mmol) Z-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> a 2,02 g (16 mmol) dihydrátu kyseliny šťavelové se rozpustí ve 100 ml methylalkoholu, k tomuto roztoku se přidá 0,8 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu 2 hodin se do reakčního roztoku zavádí vodík. Po ukončení hydrogenace se reakční směs zahřeje, katalyzátor se odstraní odfiltrováním a filtrát se odpaří. Po odpaření získaný krystalický zbytek se rozetře s diethyletherem a odfiltruje. Získá se tímto způsobem 3,9 g H-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>. (COOH)<sub>2</sub>, což odpovídá 88 % teoretického výtěžku.

T. t. = 152 až 154  $^{\circ}\text{C}$ ;

$R_f^{(3)} = 0,16$ ;

Stupeň 3

L-leucyl-L-prolin-n-decylamidhydrochlorid

3,44 g (10 mmol) H-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>. (COOH)<sub>2</sub> a 2,0 g (5 mmol) BOC-Leu-OPFP se rozpustí ve 30 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 2,8 ml (20 mmol) triethylaminu. Po pětiminutovém stání reakční směsi se tato odpaří a jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml n-hexanu. Takto získaný roztok se protřepe nejprve pětkrát vždy 30 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové, potom třikrát vždy 30 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a konečně jednou 30 ml vody, potom se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 10 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové, tento roztok se nechá stát po dobu 30 minut a potom se odpaří. Ve vakuu vypěněný amorfni zbytek se rozetře s n-hexanem, odfiltruje a ve vakuu se vysuší za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Tímto způsobem se získá 1,05 g H-Leu-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>. HCl, což odpovídá 60 % teoretického výtěžku, vztaženo na BOC-Leu-OPFP;

$R_f^{(3)} = 0,17$ .

Stupeň 4

Benzyl oxykarbonyl-L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolin-n-decylamid

1,03 g (2,55 mmol) H-leu-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>. HCl se rozpustí v 10 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 0,36 ml (2,55 mmol) triethylaminu a 1,1 g (2,55 mmol) Z-Glp-OPFP. Reakční směs se míchá po dobu 5 minut, potom se přidá dalších 0,36 ml (2,55 mmol) triethylaminu a po dalších 20 minutách míchání se reakční směs ve vakuu odpaří. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 20 ml chloroformu, získaný roztok se protřepe pětkrát nejdříve vždy 10 ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové ve vodě, potom třikrát vždy 10 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného a nakonec jednou 10 ml vody, tento roztok se vysuší pomocí bezvodého sí-

239907

ranu sodného a nakonec se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracováním s diethyletherem přivede ke krystalizaci a odfiltruje se. Tímto způsobem se získá 1,22 g Z-Glp-Leu-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>, což odpovídá 78 % teoretického výtěžku.

T. t. = 108 až 109 °C;

$R_f^{(2)} = 0,50$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -74,5^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza pro C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (mol. hmotnost 612,82):

vypočteno: C 66,64 % H 8,55 % N 9,14 %

zjištěno: C 66,43 % H 8,84 % N 9,13 %.

Stupeň 5

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolin-n-decylamid

1,22 g (2 mmol) Z-Glp-Leu-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> se rozpustí ve 30 ml methylethanolu, k tomuto roztoku se přidá 0,2 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a po dobu 30 minut se do reakční směsi zavádí plyný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracováním s n-hexanem přivede ke krystalizaci. Tímto způsobem získaný surový produkt (0,85 g) se překrystalizuje ze 4 ml ethylesteru kyseliny octové a získá se 0,74 g Glp-Leu-Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, což odpovídá 77 % teoretického výtěžku.

T. t. = 140 až 141 °C;

$R_f^{(4)} = 0,76$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -71,3^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza aminokyselin: Glu 0,97 (1,0), Leu 1,00

(1,0), Pro 1,01 (1,0).

Příklad 14

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolin-(2-dimethyl-aminoethyl)amid

11,43 g (130 mmol) BOC-Pro-OPFP se rozpustí ve 100 ml diethyletheru a tento roztok se smísí se 6,54 ml (60 mmol) N,N-dimethylaminoethylaminu. Takto získaný roztok se nechá stát po dobu 10 minut, potom se třikrát vytřepe vždy 30 ml vody, vodné fáze se spojí a přidávkou pevného uhlíkatu sodného s pH tohoto vodného roztoku nastaví na hodnotu 10. Potom se tento roztok extrahuje čtyřikrát vždy 20 ml ethylesteru kyseliny octové. Oddělené organické fáze se spojí, promyjí se 20 ml vody, potom se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina krystalizuje při stání. Uvedeným způsobem se získá 6,71 g BOC-Pro-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, což odpovídá 78,5 % teoretického výtěžku;

$R_f^{(4)} = 0,29$ .

Stupeň 2

L-leucyl-L-prolin-(2-dimethylaminoethyl)-amididihydrochlorid

6,71 g (23,5 mmol) BOC-Pro-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se zpracovává se 30 ml 5N roztoku kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové po dobu 30 minut a potom se reakční směs odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se vyjme do 50 ml chloroformu a smísí se 2,8 ml (20 mmol) triethylaminu. Takto získaný čirý roztok se smísí se 6,74 g (17 mmol) BOC-Leu-OPFP a po jedné hodině míchání se po kapkách k tomuto reakčnímu roztoku přidá dalších 2,8 ml (20 mmol) triethylaminu. Tato směs se nechá stát přes noc a příští den se odpaří. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml vody, hodnota pH roztoku se přidávkou pevného uhlíkatu sodného upraví na 10 a chráněný dipeptid se z vodné fáze vyextrahuje ethylesterem kyseliny octové. Oddělená ethylesterová fáze se vysuší pomocí bezvodého síranu vápenatého a odpaří se. Jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se zpracovává po dobu jedné hodiny 5N roztokem kyseliny chlorovodíkové v ethylesteru kyseliny octové,

potom se reakční směs odpaří a zbytek po odpaření se rozetře s diethyletherem. Po odfiltrování se amorfni a silně hygroskopický produkt vysuší ve vakuu za pomoci bezvodého hydroxidu sodného. Popsaným způsobem se získá 4,5 g H-Leu-Pro-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. HCl (12,1 mmol);  $R_f^{(4)} = 0,05$ .

### Stupeň 3

L-pyroglyutamyl-L-leucyl-L-prolin-(2-dimethyl-aminoethyl)amid

2,6 g (7 mmol) H-Leu-Pro-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. HCl se rozpustí ve 30 ml dimethylformamidu a tento roztok se smísí s 1,96 ml (14 mmol) triethylaminu. Vyloučená sraženina se odfiltruje a filtrát se po kapkách a za míchání a chlazení ledem přidá k roztoku 3,29 g (7,7 mmol) Z-Glp-OPFP v 10 ml dimethylformamidu. Po ukončení přidavku se reakční směs nechal stát po dobu 4 hodin a potom se ve vakuu odpaří. Jako zbytek získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml vody, roztok se okyslí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 3 a protřepe se třikrát vždy 20 ml ethylesteru kyseliny octové. Potom se hodnota pH vodného roztoku nastaví přidávkou pevného uhličitanu sodného na hodnotu 10 a alkalický roztok se pětkrát extrahuje vždy 30 ml ethylesteru kyseliny octové. Organické fáze se spojí, vysuší se pomocí bezvodého síranu sodného a potom se odpaří. Tímto způsobem získaný olejovitý chráněný dipeptid (3,05 g; 5,6 mmol) se rozpustí v 60 ml vody, do tohoto roztoku se přidá 5,6 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a 0,6 g 10% paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí a do této reakční směsi se po dobu 30 minut zavádí plynný vodík. Po ukončení hydrogenace se katalyzátor odfiltruje, filtrát se odpaří a jako zbytek po odpaření získaná olejovitá kapalina se rozpustí ve směsi 50 ml chloroformu a 20 ml 1N vodného roztoku hydrogen uhličitanu sodného. Organická a vodná fáze se oddělí, chloroformová fáze se vysuší pomocí bezvodého síranu sodného a odpaří. Zbytek po odpaření se rozetře s n-hexanem a odfiltruje. Popsaným způsobem se získá amorfni surový produkt (2,0 g), tento se rozpustí ve vodě, vodný roztok se vyčechří pomocí aktivního uhlí a po odfiltrování se lyofilizuje. Tímto způsobem se získá 1,72 g Glp-Leu-Pro-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, což odpovídá 60 % teoretického výtěžku.

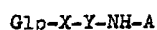
$R_f^{(4)} = 0,06$ ;

$[\alpha]_D^{25} = -71,7^\circ$  (c = 1, kyselina octová);

Analýza aminokyselin: Glu 1,02 (1,0), Leu 1,00 (1,0), Pro 1,03 (1,0).

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby tripeptidamidů obecného vzorce I



(I),

ve kterém značí

X L-norleucylovou skupinu, L-leucylovou skupinu, L-norvalylovou skupinu, D-leucylovou skupinu, L-prolylovou skupinu, L-2-aminobutyrylovou skupinu, L-valylovou skupinu, L-threonylovou skupinu, L-isoleucylovou skupinu, L-2-aminodekanoylovou skupinu, L-cyklohexylalanoylovou skupinu nebo L-ter.-butylserylovou skupinu a

Y L-prolylovou skupinu, nebo

X L-histidylovou skupinu a

Y L-homoprolylovou skupinu nebo D-pipekolylovou skupinu a

A vodíkový atom nebo alkylovou skupinu s 1 až 10 uhlíkovými atomy

nebo alkylovou skupinu substituovanou dimethylaminovým zbytkem s 1 až 3 uhlíkovými atomy v alkylové části, když ale X značí L-leucylovou skupinu, potom má A význam jiný než vodíkový atom, jakž i terapeuticky použitelných komplexů těchto sloučenin, vy-

značující se tím, že se amid aminokyseliny obecného vzorce



ve kterém mají Y a A shora uvedený význam, acyluje popřípadě chráněným L-aminokyselinovým zbytkem požadovaným pro substituent X a získaný dipeptid se acyluje L-pyroglutamovou kyselinou, popřípadě jejím chráněným a/nebo aktivovaným derivátem a popřípadě se ochranná skupina odštěpí.