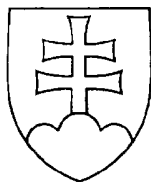


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 387

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

C07K 7/00

C07K 5/00

- (21) Číslo prihlášky: **1255-2001**
(22) Dátum podania prihlášky: **1. 3. 2000**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **7. 12. 2006**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2006**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **199 10 727.0**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **11. 3. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **9. 5. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **05/2002**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **27. 11. 2006**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP00/01751**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/53627**

(73) Majiteľ: **MERCK PATENT GmbH, Darmstadt, DE;**

(72) Pôvodca: **Jonczyk Alfred, Dr., Darmstadt, DE;**
Arnold Markus, Neu-Isenburg, DE;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob prípravy cyklo(Asp-DPhe-NMeVal-Arg-Gly)**

(57) Anotácia:

Je opísaný spôsob prípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-Dphe-NMeVal) cyklizáciou lineárneho pentapeptidu voleného zo súboru zahŕňajúceho H-Arg-(Pbf)-Gly-ASp(Obzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp-(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBz)-OH a H-NmeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp-(OBzl)-DPhe-OH, následným odstránením ochrannej skupiny a prípadne ďalšou konverziou na fyziologicky prijateľné soli.

SK 285387 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka nového spôsobu prípravy cyklického penta-peptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

Doterajší stav techniky

Cyklické pentapeptidy napríklad tiež cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) a ich fyziologicky prijateľné soli sú opísané v patentovom spise číslo EP 0 770 622. Tento vynález je výberovým vynálezom s ohľadom na EP 0 770 622.

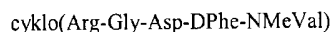
Všeobecne sa cyklické peptidy získavajú cyklizáciou lineárnej prekurzorovej molekuly za obvyklých podmienok syntézy peptidov. Aby mohla byť zaručená selektívna väzba dvoch aminokyselín alebo dvoch segmentov skladajúcich sa z niekoľkých aminokyselín, alebo alternatívne cyklizácia lineárneho peptidu, je potrebné blokovat' vhodnými chrániacimi skupinami zodpovedajúce funkčné časti aminokyselín, ktoré sa nemajú na reakcii podieľať. Boli preto vyvinuté rôzne typy chrániacich skupín pre aminokyseliny, pre skupiny karboxylové, hydroxylové, tiolové alebo karboxamidok skupiny a tiež pre guanidínové skupiny alebo pre imidazolový dusík, ktoré v svojich kombináciách umožňujú veľkú možnosť obmien s ohľadom na optimalizáciu uvedených reakcií. Syntéza lineárnych prekurzorových molekúl, lineárnych peptidov sa môže navyše vykonávať dvoma spôsobmi, jednak syntézou peptidu v pevnej fáze, jednak v roztoku. V tomto prípade sú možné postupné kopulácie aminokyselín alebo fragmentové kondenzácie segmentov aminokyselín. Príslušné kopulačné stupne sa môžu opäť vykonávať pri pomoci rôznych kondenzačných činidiel, ako sú karbodiimidy, karbodiimidazol, zlúčeniny uróniového typu, ako TBTU, alebo spôsobmi používajúcimi zmesové anhydridy alebo aktívne estery.

Vynález je založený na vyvinutí nového zlepšeného spôsobu prípravy cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) v porovnaní s dosiaľ známymi spôsobmi.

S prekvapením sa zistilo, že pri syntéze cyklopeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) cyklizáciou lineárnej prekurzorovej molekuly, kombinácie chrániacich skupín 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofurán-5-sulfonylovej (Pbf) pre guanidínoskupinu vo vedľajšom reťazci arginínu a benzylovej (Bzl) pre karboxylovú skupinu vo vedľajšom reťazci asparágovej kyseliny vedie k optimalizácii výťažku.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je spôsob prípravy cyklického pentapeptidu



cyklizáciou lineárneho pentapeptidu voleného zo súboru zahŕňajúceho

H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH alebo H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH, následným odstránením chrániacej skupiny a prípadne ďalšou konverziou na fyziologicky prijateľnej soli.

Vynález sa ďalej týka spôsobu prípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal),

ktorý spočíva v tom, že lineárny pentapeptid H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH sa cyklizuje.

Reakčné podmienky tejto cyklizácie lineárnych pentapeptidov volených so súboru zahŕňajúceho H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH alebo H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH, s ohľadom na voľbu dehydratačného činidla, inertného rozpúšťadla a reakčnej teploty a ďalšiu premenu na ich fyziologicky prijateľné soli sú opísané v EP 0770 622.

Benzylová chrániaca skupina na vedľajšom reťazci asparágovej kyseliny môže byť odstránená za obvyklých podmienok (napríklad T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, 2. vydanie, vydavateľ Wiley, New York 1991; alebo P. J. Kocienski, Protecting Groups 1. vydanie, nakladateľ George Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1994; H. Kunz, H. Waldmann, Comprehensive Organic Synthesis, zv. 6, (vydavateľ B. M. Trost, I. Fleming, E. Winterfeldt), Pergamon, Oxford str. 631 až 701, 1991)) napríklad spracovaním vodíkom v prítomnosti katalyzátora (napríklad vzácného kovu, ako je paládium na uhli). Vhodnými rozpúšťadlami sú napríklad etanol alebo metanol alebo amidy ako dimetylformamid alebo zmesi s ďalšími inertnými rozpúšťadlami, ako sú napríklad zmesi s vodou. Hydrolyza sa vykonáva spravidla pri teplotách približne 0 až 100 °C a tlakoch približne 0,1 až 20 MPa, výhodne 20 až 30 °C a 0,1 až 1 MPa.

Chrániaca skupina Pbf, ktorú zaviedol do chémie peptidov L. A. Carpio a kol. (Tet. Let. 34, str. 7829 - 7832, 1993), sa odstraňuje napríklad 95 % trifluóroctovou kyselinou (TFA). Chrániaca skupina Pbf má v tomto prípade väčšiu labilitu s ohľadom na TFA ako štruktúrne podobné chrániace skupiny 4-metoxy-2,3,6-trimetylfenylsulfonylová (Mtr) a 2,2,5,7,8-pentametylochromán-6-sulfonylová (Pmc), ktoré sú tiež možnými chrániacimi skupinami vedľajšieho reťazca pri príprave cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

Trifluóroctová kyselina sa výhodne používa v nadbytku bez prísady ďalšieho rozpúšťadla. Trifluóroctová kyselina sa môže tiež použiť ako zmes s inertným rozpúšťadlom, ako je napríklad kombinácia TFA/dichlómetán v pomere 6 : 4. TFA sa môže okrem toho tiež použiť s prísadou 1 až 10 %, výhodne 2 % vody. Reakčná teplota pre odštiepenie je výhodne približne 0 až 50 °C a reakcia sa výhodne vykonáva pri teplote 15 až 30 °C (pri teplote miestnosti).

Uvedené skratky aminokyselín majú nasledujúci výz-

| | |
|-----|---------------------|
| Asp | asparágová kyselina |
| Arg | arginín |
| Gly | glycín |
| Phe | fenylalanín |
| Val | valín |

Okrem toho sa ešte uvádzajú skratky, ktoré majú nasledujúci význam:

| | |
|------|--|
| BOC | terc-butoxykarbonyl |
| Bzl | benzyl |
| CHA | cyklohexylamin |
| D | charakterizácia D-aminokyseliny |
| DCCI | dicyklohexylkarbodiimid |
| DMAP | dimetylaminopyridín |
| DMF | dimetylformamid |
| EDCI | N-etyl-N,N'-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid, |

| | |
|------|---|
| | hydrochlorid |
| Et | etyl |
| Fmoc | 9-fluórenylmetoxykarbonyl |
| HOBt | 1-hydroxybensotriazol |
| Me | metyl |
| MTBE | metylerc-butyléter |
| Mtr | 4-metoxi-2,3,6-trimetylfenylsulfonyl |
| NMe | N-metylovaná α -aminoskupina |
| NMP | N-metylpyrolidón |
| OtBu | terc-butylester |
| OMe | metyléster |
| OEt | etyléster |
| Pbf | 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofurán-5-sulfonyl |
| Pmc | 2,2,5,7,8-pentametylchromán-6-sulfonyl |
| POA | fenoxycetyl |
| Pr | propyl |
| Su | sukcinimid |
| TBTU | 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluróniumtetrafluórborát |
| TFA | trifluóroctová kyselina |
| Z | benzyloxykarbonyl |

Tiež sa s prekvapením zistilo, že špecifická voľba chrániacich skupín vedľajších reťazcov Pbf na Arg a Bzl na Asp i pri syntéze lineárnych peptidov, ktoré, ako bolo skôr uvedené, sú medziproduktmi v syntéze cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), vedie k zlepšeným výťažkom v príslušných stupňoch syntézy. Výsledkom je, že výťažok cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) je všeobecne zvýšený a z toho plyne zníženie nákladov na syntézu.

Zlepšenie výťažku sa dosahuje v tomto prípade tak pri syntéze peptidu v pevnej fáze ako v roztoku lineárnych peptidov

H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH,
H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH,
H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH,
H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH alebo
H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH,
najmä H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-ArgCPbf)-Gly-OH.

Chránené aminokyseliny alebo fragmenty aminokyselín, používané v oboch spôsoboch syntézy, sa pripravujú zvyčajne spôsobmi syntézy aminokyselín a peptidov opísanými v štandardných publikáciách (Principles of Peptide Synthesis, vydavateľ M. Bodansky, Springer Verlag Berlin 1984; Houben Weyl, Methoden der organischen Chemie [Methods of Organic Chemistry], zv. 15/11, str. 1 až 806 1974, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Calbiochem/Novabiochem Catalogue and Synthesis Handbook 1999; Synthesis Notes or Peptide Synthesis Protocols, vydavateľ M. W. Pennington a B. M. Dunn, Methods in Molecular Biology, zv. 35, Humana Press Totowa N. J. 1994), a to za reakčných podmienok, ktoré sú pre menované reakcie známe a vhodné. Pritom sa môžu tiež používať známe, tu bližšie neopísované varianty.

Základné princípy syntézy peptidov v pevnej fáze vypracovali B. F. Gysin a R. B. Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 94, od str. 3102, 1972). Opísaná syntéza lineárnych peptidov v pevnej fáze, ich izolácia a čistenie sa vykonáva spôsobom, ktorý opísal A. Jonczyk a J. Meienhofer (Peptides, 8th Am. Pept. Symp., vydavateľ V. Hruby a G. H. Rich, Pierce Comp. III, str. 73 až 77, 1983) alebo obdobne spôsobmi opísanými v Angew. Chem. 104, str. 375 až 391, 1992.

Osobitne výhodne sa lineárne peptidy syntetizujú, ako je opísané, konvergentne fragmentovou kondenzáciou.

Vynález sa preto ďalej týka spôsobu prípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), ktorý spočíva v tom, že syntéza lineárneho peptidu H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH sa vykonáva konvergentne fragmentovou kondenzáciou tripeptidu R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, kde znamená R¹ skupinu chrániacu aminoskupinu s dipeptidom H-Arg(Pbf)-Gly-R³, kde znamená R² skupinu chrániacu karboxylovú skupinu a chrániace skupiny R¹ a R² sa potom odstraňujú.

Symbol R¹ znamená skupinu chrániacu aminoskupinu. Výraz „skupina chrániaca aminoskupinu“ je všeobecne známy a ide o skupiny, ktoré sú vhodné na ochranu (blokovanie) aminoskupiny pred chemickými reakciami, ktoré sú však ľahko odstrániteľné, keď je žiaduca reakcia na inom mieste molekuly vykonaná. Typické pre také skupiny sú najmä nesubstituované alebo substituované skupiny acylové, arylové, aralkoxymetylové alebo aralkylové. Pretože sa skupiny, chrániace aminoskupinu, po žiaducej reakcii (alebo po slede reakcií) odstraňujú, nemá ich druh a veľkosť rozhodujúci význam. Výhodné sú však skupiny s 1 až 20 atómami uhlíka. Výraz „acylová skupina“ sa tu vždy rozumie v najširšom zmysle slova. Zahŕňa acylové skupiny odvodené od alifatických, aralifatických, aromatických alebo heterocyklických karboxylových alebo sulfónových kyselín, ako najmä skupiny alkoxykarbonylové, alkenyloxykarbonylové, aryloxykarbonylové a predovšetkým aralkoxykarbonylové. Ako príklady takých acylových skupín sa uvádzajú skupiny formylová alebo alkanoylové skupiny ako skupina acetylová, propionyllová, butyrylová skupina; aralkanylové ako fenylacetylová skupina; arylové ako benzoylelová alebo toluylelová skupina; aryloxyalkanylové ako fenoxycetylová skupina; alkoxykarbonylové, ako skupina metoxykarbonylová, etoxykarbonylová, 2,2,2-trichlóretoxykarbonylová, terc-butoxykarbonylová (BOC), 2-jedotoxykarbonylová; alkenyloxykarbonylové ako aryloxykarbonylová (Aloc); aralkyl-oxykarbonylové ako skupina benzyloxykarbonylová (CBZ, synonymum Z), 4-metoxybenzyloxykarbonylová (MOZ), 4-nitrobenzyl-oxykarbonylová alebo 9-fluórenylmetoxykarbonylová (FMOC), 2-(fenylsulfonyl)etoxykarbonylová; trimetylsilyletoxykarbonylová skupina (Teoc); a arylsulfonylová skupina ako skupina 4-metopxy-2,3,6-trimetylfenylsulfonylová skupina (Mtr). Ako skupina chrániaca aminoskupinu je ďalej známa tritylová skupina (Trt). Výhodnými skupinami, chrániacimi aminoskupinu, sú skupiny BOC a Fmoc a Aloc, ďalej Z, benzylová a acetylová skupina. Osobitne výhodná je skupina Boc.

Symbol R³ znamená skupinu chrániacu karboxylovú skupinu. Výraz „skupina chrániaca karboxylovú skupinu“ je všeobecne známy a ide o skupiny, ktoré sú vhodné na ochranu hydroxylovej skupiny karboxylovej kyseliny pred chemickými reakciami. Typickými skupinami tohto typu sú uvedené nesubstituované alebo substituované skupiny arylové, aralkylové, arylové alebo acylové, ďalej tiež skupiny alkylové, arylové a aralkylsilylové. Pretože sa skupiny, chrániace karboxylovú skupinu, po žiaducej reakcii (alebo po slede reakcií) odstraňujú, nemá ich druh a veľkosť rozhodujúci význam. Výhodné sú však skupiny s 1 až 20 a najmä s 1 až 10 atómami uhlíka. Pretože príklady skupín, chrániacich hydroxylovú skupinu, sa uvádzajú skupiny aralkylové ako benzylová, 4-metoxybenzylová alebo 2,4-dimetoxybenzylová skupina; arylové ako benzoylelová alebo p-nitrobenzoylelová skupina acylové ako acetylová alebo pivaloylelová skupina; p-toluénsulfonylová skupina; alkylové ako metylová alebo terc-butylelová skupina; ale tiež alylová

skupina; alkylsilylové ako trimetylsilylová (TMS), triizopropylsilylová (TIPS), terc-butyldimetylsilylová (TBS), trietylsilylová alebo trimetylsilyletylová skupina; alebo aralkylsilylové ako terc-butyldifenylsilylová (TBDPS) skupina. Výhodnými skupinami, chrániacimi karboxylovú skupinu, sú skupina metylová, benzylová, acetylová, terc-butylová alebo TBS. Osobitne výhodná je skupina metylová a terc-butylová skupina.

Všeobecne výhodnými chrániacimi skupinami pre karboxylovú skupinu asparágovej kyseliny ako vedľajšieho reťazca sú lineárne alebo rozvetvené alkylové skupiny, ako skupina metylová, etylová alebo terc-butylová, alebo aralkylové skupiny, ako skupina benzylová. Pri spôsobe podľa vynálezu je výhodná skupina benzylová.

Všeobecne výhodnými chrániacimi skupinami pre guanidino-skupinu arginínového vedľajšieho reťazca sú napríklad skupina Z, Boc, Mtr alebo Pmc. Pri spôsobe podľa vynálezu je výhodná skupina Pbf.

Uvoľňovanie chrániacej skupiny použitej v ktoromkoľvek prípade je známe z literatúry (napríklad T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, druhé vydanie, Wiley, New York, 1991; alebo P. J. Kocienski, *Protective Groups*, 1. vyd. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 1994). Pritom sa môžu tiež používať známe, tu bližšie neopísované varianty.

Vynález sa týka opísaného spôsobu, ktorý spočíva v tom, že tripeptid R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, kde znamená R¹ skupinu chrániacu aminoskupinu, sa pripraví lineárnou syntézou reakciou Z-DPhe-OH s H-NMeVal-OMe na H-DPhe-NMeVal-OMe a potom jeho reakciou s aktivovaným derivátom R¹-Asp(OBzl)-OH a štiepením metylesteru.

Výhodným derivátom R¹-Asp(OBzl)-OH je sukcinimid R¹-Asp(OBzl)-OSu. Ďalšie aktívne estery, ktoré je možné použiť, sú známe zo všeobecnej literatúry o peptidoch.

Vynález sa ďalej týka opísaného spôsobu, pri ktorom dipeptid H-Arg(Pbf)-Gly-R², kde znamená R² skupinu chrániacu karboxylovú skupinu, sa pripraví lineárnou syntézou reakciou Z-Arg(Pbf)-OH a chrániaca skupina Z sa odstráni.

Podobne sa vynález týka lineárnych pentapeptidov, volených so súboru zahŕňajúceho H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH alebo H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH, ako medziproduktov na syntézu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

Vynález sa týka spôsobu prípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal),
 a) reakciou dipeptidu H-Arg(Pbf)-Gly-R², pripraveného lineárnou syntézou Z-Arg(Pbf)-OH s H-Gly-R² a následným odstránením chrániacej skupiny Z,
 b) s tripeptidom R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, pripraveným lineárnou syntézou Z-DPhe-OH s H-NMeVal-OMe a odstránením chrániacej skupiny Z za získania H-DPhe-NMeVal-OMe a následnou kopuláciou tohto peptidu na aktívny ester R¹-Asp(OBzl)-OH a následným štiepením metylesteru, konvergentne za získania lineárneho pentapeptidu R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-R²,
 c) odstránením chrániacich skupín R¹ a R²,
 d) cyklizáciou uvoľneného pentapeptidu H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, za získania cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal),
 e) odstránením benzylovej chrániacej skupiny,

f) odstránením chrániacej skupiny Pbf trifluóroctovou kyselinou a prípadne premenou trifluóracetátu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), pripraveného v stupňoch a) až f) na ďalšie fyziologicky prijateľné soli.

Ďalšími fyziologicky prijateľnými soľami sú napríklad soli anorganických kyselín, ako je kyselina sírová, siričitá, ditiónová, dusičná, hydrohalogenidové kyseliny, ako kyselina chlorovodíková alebo bromovodíková, fosforečné kyseliny, ako je kyselina ortofosforečná, sulrámová kyselina, ďalej organických kyselín, ako sú predovšetkým alifatické, alicyklické, aralifatické, aromatické alebo heterocyklické jednosýtné alebo niekoľkosýtné karboxylové, sulfónové alebo sírové kyseliny, napríklad kyselina mravčia, octová, propiónová, hexánová, oktánová, dekánová, hexadekánová, oktadekánová, pivalová, dietyloctová, malónová, jantárová, pimelová, fumarová, maleínová, mliečna, vínna, jablčná, citrónová, glukónová, askorbová, nikotínová, izonikotínová, metánsulfónová alebo etánsulfónová, benzensulfónová, terimetoxybenzoová, adamantankarboxylová, p-toluénsulfónová, glykolová, embónová, chlórformoxyoctová, asparágová, glutámová, prolín, glyoxylová, palmitová, parachlórformoxyizomaslová, cyklohexánkarboxylová, glukózo-1-fosfát, naftalénmonosulfónová a disulfónová a laurylsírová kyselina.

Osobitne výhodnými fyziologicky prijateľnými soľami sú hydrochlorid alebo interné soli cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

Keď znamená R¹ Boc a R² terc-butylovú skupinu, môžu byť tieto terc-butyly podobné koncové chrániace skupiny štiepené mravčou kyselinou, bez napadnutia chrániacich skupín Pbf a Bzl vedľajšieho reťazca.

Ďalšie príklady opisujú špecifické uskutočnenia jednotlivých syntéznych stupňov. Všetky teploty sú v °C.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Syntéza Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH

1. Do roztoku 26,5 g Z-NMeVal-OH v 200 ml metanolu sa prikvapká 25,3 ml trimetylchlórsilanu a zmes sa mieša cez noc. Reakčná zmes sa zbaví rozpúšťadla a zvyšok sa vyberie do metyl-terc-butyléteru (MTBE) a premyje sa 5 % roztokom uhličitanu sodného a vodou. Po odstránení rozpúšťadla sa zvyšok vyberie do metanolu a 1N kyseliny chlorovodíkovej, zmieša sa s vodou navlhčeným 10 % paládiumom na uhlí a hydrogenuje sa v miernom prúde vodíka. Po ukončení reakcie sa katalyzátor odfiltruje, filtrát sa zbaví rozpúšťadla a zvyšok sa prekryštalizuje z etylacetátu. Získa sa hydrochlorid H-NMeVal-OMe v 75 % výťažku.

Roztok 16,1 g Z-DPhe-OH, 10 g hydrochloridu H-NMeVal-OMe a 10,1 ml diizopropyletylamínu v 100 ml dichlórmetánu sa chladí na teplotu 0 až 5 °C a pridá sa 11,35 g EDCI. Zmes sa napred mieša jednu hodinu pri teplote 0 až 5 °C, potom cez noc pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa odstráni a zvyšok sa vyberie do MTBE a premyje sa uhličitanom sodným (5 % roztok), 1N kyselinou chlorovodíkovou a vodou a usuší sa. Po odstránení rozpúšťadla sa získa Z-DPhe-NMeVal-OMe v 84,5 % výťažku.

Rozpustí sa 12 g Z-DPhe-NMeVal-OMe v 80 ml THF a 20 ml vody, zmieša sa s 10 mg tymolftaleínu a prikvapká sa 10M roztok hydroxidu sodného až do modrého zafarbenia indikátora. Po odfarbení indikátora sa zmes opakovane spracuje prikvapkaním 10 M roztoku hydroxidu sodného. Pokiaľ sa už odfarbovanie indikátora nepozoruje, nastaví sa roztok na hodnotu pH 2 10 % roztokom hydrogensíranu

draselného, metanol sa odstráni a produkt sa extrahuje MTBE. Po vysušení síranom sodným sa soľ CHA z filtrátu vyzráža pridaním 2,9 ml CHA. Získa sa Z-DPhe-NMeVal-OH x CHA v 90 % výtlačku.

4. Mieša sa 16,4 g Z-DPhe-NMeVal-OH x CHA (cyklohexylamóniovej soli) v 250 ml MTBE a 100 ml kyseliny fosforečnej (10 %) až do úplného rozpustenia. Po odstránení vodnej fázy sa organická fáza premyje vodou a nasýteným roztokom chloridu sodného a vysuší sa. Rozpúšťadlo sa odstráni a zvyšok sa vyberie do 15,2 ml 2N roztoku hydroxidu sodného a 150 ml THF a po pridaní väčšiny katalyzátora (1 g 10 % paládia na uhlí) sa hydrogenuje v miernej prúde vodíka. Katalyzátor sa odfiltruje a čirý roztok sa spracuje 12,1 g Boc-Asp(OBzl)-OSu a 4,5 ml trietylaminu a mieša sa cez noc pri teplote miestnosti. Po odstránení rozpúšťadla sa zvyšok vyberie do MTBE a premyje sa kyselinou fosforečnou (10 %), vodou a nasýteným roztokom chloridu sodného. Organická fáza sa spracuje 3,3 ml CHA. Výsledná soľ Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMe-Val-OH x CHA sa odfiltruje a vysuší sa vo vákuu. Výtlačok je 93 %.

Príklad 2

Syntéza H-Arg(Pbf)-Gly-OtBu

1. Mieša sa 33,0 g Z-Arg(Pbf)-OH x CHA v 300 ml octovej kyseliny a 300 ml kyseliny fosforečnej až do rozpustenia. Po odstránení vodnej fázy sa organická fáza premyje vodou a nasýteným roztokom chloridu sodného a vysuší sa. Rozpúšťadlo sa odstráni a zvyšok sa rozpustí v 250 ml dichlórmetánu s 8,38 g H-Gly-OtBu x HCl a ochladí sa na teplotu 0 °C. Pridá sa 17, 12 ml diizopropyletylamínu a 16,05 g TBTU a zmes sa mieša 60 minút pri teplote 0 °C a cez noc pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa odstráni a nahradí sa 250 ml etylacetátu. Po premytí roztokom uhličitanu sodného (5 %), vodou a nasýteným roztokom chloridu sodného sa rozpúšťadlo odstráni. Získa sa Z-Arg(Pbf)-Gly-OtBu v 86 % výtlačku.

2. Roztok 30 g Z-Arg(Pbf)-Gly-OtBu v 350 ml THF sa zmieša s 3 g vodou navlhčeného 10 % paládia na uhlí a Z-skupina sa odstráni hydrogenáciou miernym prúdom vodíka. Katalyzátor sa odfiltruje a rozpúšťadlo sa odstráni. Zvyšok sa vyberie do etylacetátu a spracuje sa ďalej ako v príklade 2.1. Získa sa Z-Arg(Pbf)-Gly-OtBu v 86 % výtlačku.

Príklad 3

Syntéza H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH

Premení sa 1,23 g Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH x CHA obvyklým spôsobom na voľnú kyselinu, ktorá sa rozpustí v 12,5 ml dichlórmetánu s 0,81 g H-Arg(Pbf)-Gly-OtBu a 0,22 g DMAP. Roztok sa ochladí na 0 až 5 °C a spracuje sa 0,345 g EDCI. Mieša sa dve hodiny pri teplote 0,5 °C a cez noc pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa odstráni, zvyšok sa vyberie do MTBE a spracuje sa ďalej ako v príklade 2.1. Získa sa Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OtBu v 82 % výtlačku.

Rozpustí sa 2,3 g Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OtBu v 23 ml 95 % mravčej kyseliny na odstránenie koncových chrániacich skupín a skoncentruje sa vo vákuu počas 30 minút. Produkt sa triture s éterom, odfiltruje sa a vysuší sa vo vákuu. Získa sa Boc-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH x HCOOH v 95 % výtlačku.

Príklad 4

Syntéza cyklo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal)

Roztok 11,9 g H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH x HCOOH v 60 ml MNMP sa prikvapká do miešaného roztoku 7,25 g TBTU a 7,45 ml N-metylmorfolínu

vo 180 ml N-metylpyrolidónu. Reakčný roztok sa mieša 20 hodín, potom sa prikvapká do roztoku 47,5 g hydrogenuhličitanu sodného v 1800 ml vody. Zrazenina sa odfiltruje a vysuší sa vo vákuu. Získa sa cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal) v 73,4 % výtlačku.

Príklad 5

Syntéza cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal)

1. Roztok 2 g cyklo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal) v 26 ml THF sa zmieša s 0,5 g 10 % paládia na uhlí. Nechá sa prebublávať dve hodiny vodík, zmes sa zbaví katalyzátora a rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu. Produkt vykryštalizuje po pridaní 32 ml acetónu, odfiltruje sa a vysuší. Získa sa cyklo-(Arg(Pbf)-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) v 83 % výtlačku.

2. Rozpustí sa 1,5 g cyklo(Arg(Pbf)-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) v 15 ml 95 % TFA. Po jednej hodine sa roztok prikvapká do 150 ml izopropyléru a pevná látka sa odfiltruje a vysuší. Vysušený produkt sa rozpustí v 30 ml zmesi izopropanol/voda 1 : 2 a spracuje sa iónomeničom III (acetátová forma; Merck KGaA). Sfiltrovaný roztok sa skoncentruje a vysuší sa vymrazovaním. Získa sa cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) v podobe vnútornej soli v 96 % výtlačku.

Priemyselná využiteľnosť

Spôsob prípravy cyklického pentapeptidu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) v ďaleko väčšom výtlačku ako dosiaľ známymi spôsobmi.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob prípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal)

cyklizáciou lineárneho pentapeptidu voleného so súboru zahrňajúceho

H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH, H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH, H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH a H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH, následným odstránením chrániacej skupiny a prípadne ďalšou konverziou na fyziologicky prijateľné soli.

2. Spôsob prípravy cyklického pentapeptidu

cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal)

podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že sa cyklizuje pentapeptid H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že sa syntéza lineárneho peptidu H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH vykonáva konvergentne fragmentovou kondenzáciou tripeptidu R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, kde znamená R¹ skupinu chrániacu aminoskupinu, s dipeptidom H-Arg-(Pbf)-Gly-R², kde znamená R² skupinu chrániacu karboxylovú skupinu a chrániace skupiny R¹ a R² sa odstránia.

4. Spôsob podľa nároku 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že tripeptid R¹-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH, kde znamená R¹ skupinu chrániacu aminoskupinu, sa

pripraví lineárnou syntézou reagovaním Z-DPhe-OH s H-NMeVal-OMe sa získania H-DPhe-NMeVal-OMe, ktorý sa necháva reagovať s aktivovaným derivátom R¹-Asp(OBzl)-OH a metylester sa štiepi.

5. Spôsob podľa nároku 1 až 3, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že dipeptid H-Arg(Pbf)-Gly-R², kde znamená R² skupinu chrániacu karboxylovú skupinu, sa pripraví lineárnou syntézou reagovaním Z-Arg(Pbf)-OH s H-Gly-R² a odstránením chrániacej skupiny Z.

6. Lineárne pentapeptidy volené zo súboru zahŕňajúceho

H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-OH,
H-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-OH,
H-Asp(OBzl)-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH,
H-DPhe-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-OH a
H-NMeVal-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OBzl)-DPhe-OH
ako medziprodukty na syntézu cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

Koniec dokumentu
