



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1627087** **A3**

(51) **S** C 07 D 471/04 // A 61 K 31/505

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

ВСТУПАЮЩАЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА

(21) 4202677/04

(22) 05.06.87

(31) 871539

(32) 06.06.86

(33) US

(46) 07.02.91. Бюл. № 5

(71) Дзе Трастиз оф Принстон Универ-
сити (US)

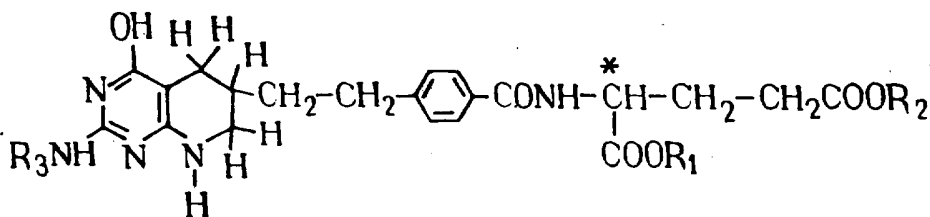
(72) Эдуард С.Тейлор, Джордж Питер
Бердсли (US), Чуан Ших (CN) и Сти-
вен Р.Флетчер (GB)

(53) 547.854.4.07(088.8)

(56) Гринштейн Дж., Виниц М. Химия
аминокислот и пептидов. - М.: Мир,
1965, с.134.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДИАСТЕРЕОМЕРА
N-{4-[2-(2-АМИНО-4-ГИДРОКСИ-5,6,7,8-
-ТЕТРАГИДРОПИРИДО[2,3-d]ПИРИМИДИН-6-
-ИЛ)ЭТИЛ]БЕНЗОИЛ}-L-ГЛУТАМИНОВОЙ
КИСЛОТЫ СО ЗНАЧЕНИЕМ $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} -21,06^\circ$
ИЛИ ДИАСТЕРЕОМЕРА N-{4-[2-(2-АМИНО-4-
-ГИДРОКСИ-5,6,7,8-ТЕТРАГИДРОПИРИДО

2
[2,3-d]ПИРИМИДИН-6-ИЛ)ЭТИЛ]БЕНЗОИЛ}-
-L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ СО ЗНАЧЕНИЕМ
 $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} +31,09$ ИЛИ ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕ-
СКИ ПРИЕМЛЕМЫХ СОЛЕЙ С ОСНОВАНИЕМ
(57) Изобретение относится к гетеро-
циклическим соединениям, в частно-
сти к получению диастереомера N-{4-
-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тет-
рагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил]
этил]бензоил}-L-глутаминовой кисло-
ты со значением $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} -21,06^\circ$
или диастереомера N-{4-[2-(2-амино-
4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо
[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил -
-L-глутаминовой кислоты со значением
 $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} +31,09^\circ$ или их фармацевти-
чески приемлемых солей с основанием,
обладающих противоопухолевой актив-
ностью. Цель - разработка способа
получения более активных соединений.
Получение ведут из диастереомеров
ф-лы



где R₁ и R₂ (одинаковые или различ-
ные) - C₁-C₄-алкил; R³ - H или C₁-C₆-
ацил; конфигурация атома углерода
со знаком * является L-конфигурацией,
и хиральной кислоты. Полученные две
диастереомерные соли указанного соеди-
нения разделяют, выделяют из указан-
ной соли катионную часть действием

основания и удаляют защитные группы.
Выделение свободного основания прово-
дят в виде отдельной стадии до или
после удаления защитных групп, либо
с удалением защитных групп. Целевые
продукты получают практически в ви-
де индивидуальных диастереомеров.
2 табл.

(19) **SU** (11) **1627087** **A3**

Изобретение относится к способу получения новых оптически активных форм N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты, обладающих противоопухолевой активностью.

Цель изобретения - разработка способа получения оптически активных форм N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты, обладающих более высокой противоопухолевой активностью.

Пример 1. Смесь 1 г диэтилового эфира N-{4-[2-(2-ацетида-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты и 880 мг d(+)-10-камфорсульфоновой кислоты в 50 мл безводного этанола кипятят 4 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и оставляют на сутки. Образовавшееся белое твердое вещество отделяют фильтрованием и подвергают дробной кристаллизации с получением 37 мг диастереомера B d(+)-10-камфорсульфоната диэтилового эфира N-{4-[2-(2-ацетида-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты, т.пл. 223-225°C, $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} = -20,02^\circ$.

Из маточного раствора испарением удаляют растворитель и полученный твердый остаток дважды перекристаллизовывают из этанола с получением диастереомера "А" d(+)-10-камфорсульфоната диэтилового N-{4-[2-(2-ацетида-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты, $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} = +29,35$.

Раствор диастереомера B d(+)-10-камфорсульфоната диэтилового эфира N-{4-[2-(2-ацетида-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты в 50 мл метанола, содержащего 3 мл 1 н. водного раствора гидроокиси натрия, перемешивают 72 ч при комнатной температуре. После добавления 2 мл уксусной кислоты смесь центрифугируют с получением диастереомера B N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-

-L-глутаминовой кислоты, т.пл. 224-227°C (с разложением), $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} = -21,0581^\circ$ (C = 0,636, 0,1N NaOH).

ЯМР (CDCl₃), δ : 1,85 (м, 2H); 1,98 (м, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,45 (м, 1H); 2,68 (м, 1H); 2,92 (м, 5H); 3,25 (т, J = 10 Гц, 1H); 3,82 (д, J = 10 Гц, 1H); 5,13 (м, 1H); 7,43 (д, J = 9 Гц, 2H); 7,84 (д, J = 9 Гц, 2H).

Оптическая чистота >97%.

По описанной методике, но используя диастереомер A d(+)-10-камфорсульфоната диэтилового эфира N-{4-[2-(2-ацетида-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты вместо B изомера получают диастереомер A N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты, т.пл. 253-255°C.

Пример 2. К раствору, содержащему 100 мг (0,187 ммоль) диэтилового эфира N-{4-[2-(2-ацетида-4-окси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты в 6 мл сухого этанола, прибавляют 122,7 г (+)-3-бромкамфор-8-сульфонокислоты (0,374 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и выдерживают в течение ночи. Твердый осадок собирают фильтрацией под вакуумом, получают 40 мг (31%) соответствующей соли.

ВЭЖХ-анализ указанного продукта показывает, что он обогащен диастереомером с коэффициентом обогащения 3,3 (соотношение 23:77) (с другой стороны, маточный раствор обогащен другим диастереомером с коэффициентом обогащения 3,2, соотношение 7:24). Повторение указанного ВЭЖХ-разделения дает выделенный диастереомер с требуемой оптической чистотой >95%.

Пример 3. 10 г N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты (B-диастереомер) суспендируют в 40 мл воды (pH ~ 5,0). К полученной суспензии прибавляют по каплям при перемешивании 8 мл 5,0 н. водного раст-

вора гидроокиси натрия и затем раствор 1,0 н. гидроокиси натрия до тех пор, пока в растворе не появится твердое вещество ($\sim 3,5$ мл), pH раствора при этом ~ 8 . Затем прибавляют 50 мл метанола и раствор выдерживают в холодильнике в течение ночи. Образующееся твердое тело собирают фильтрацией, промывают небольшим количеством холодного метанола и сушат в вакууме при комнатной температуре, получают диастереомер В N-[4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты (8,1 г).

ИК (KBr): 3440-3120, 1640, 1620, 1600, 1548, 1504, 1402, 1368, 1310 см^{-1} .

ЯМР (300 МГц, D_2O), δ : 7,76 (д, 2H, J = 6 Гц); 4,32 (кв, 1H, J = 9 Гц, 5 Гц); 3,33 (кв, 1H, J = 11 Гц, 2 Гц); 2,95 (кв, 1H, J = 11,9 Гц); 2,75 (м, 2H); 2,55 (кв, 1H, J = 11 Гц, 3 Гц); 1,20 (т, 2H, J = 7 Гц); 2,17 (м, 1H); 2,14 (м, 2 Гц); 1,76 (м, 1H); 1,68 (м, 3H).

Вычислено, %: C 46,58; H 5,40; N 12,93.

$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5\text{Na}_2$

Найдено, %: C 45,98; H 5,20; N 12,40.

Пример 4. Значения ИК₅₀ определяют на полной клеточной линии лейкомы человека CCRF-CEM для диастереомеров А и В. Получают следующие экспериментальные результаты. ИК₅₀ мкг/мл:

Диастереомер А	$2,6 \cdot 10^{-3}$
Диастереомер В	$3,4 \cdot 10^{-3}$

Пример 5. В подмышечную область мышей C57BL/6 имплантируют подкожно клетки опухоли мелома В-16. Для каждой дозировки используют группу 10 мышей. После ежедневного внутрибрюшинного введения каждого диастереомера N-[4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты (диастереомер А и В) через десять дней закармливают массу опухоли контрольных животных (получивших только разбавитель) и сравнивают с опухолями животных, получавших ис-

пытываемое соединение, на основании чего подсчитывают процент ингибирования.

Полученные результаты приведены в табл.1.

Пример 6. Группы женских особей мышей СЗН в количестве 10 шт. заражают внутрибрюшинно в подмышечной области клетками лимфосаркомы 6СЗНED. Затем в течение 8 дней вводят испытываемое соединение внутрибрюшинно в эмульторе (0,5 мл). Контрольные животные проходят такую же обработку, но без испытываемого соединения.

Полученные результаты приведены в табл.2.

Пример 7. Группам мышей СЗН имплантируют клетки СЗН аденокарциномы молочной железы, после чего вводят изомер В, причем контрольные животные получают только разбавитель.

Результаты испытаний приведены в табл.3.

Пример 8.

Клеточную плазму клеток миеломы X5563 имплантируют группам мышей СЗН, после чего вводят изомер В, при этом контрольные животные получают только разбавитель.

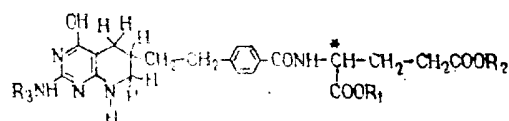
Результаты испытаний даны в табл.4. (внутрибрюшинно - 0,6 мл/день в эмульторе ежедневно в течение 10 дней).

Диастереомеры, получаемые по предлагаемому способу, обладают более высокой противоопухолевой активностью, чем их смеси, и относятся к группе малотоксичных соединений.

Формула изобретения

Способ получения диастереомера N-[4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589\text{ мкм}}^{25} -21,06^\circ$

или диастереомера N-[4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589\text{ мкм}}^{25} +31,09^\circ$ или их фармацевтически приемлемых солей с основанием, отличающийся тем, что раствор смеси диастереомеров общей формулы



где R^1 и R^2 - одинаковые или различные - C_1-C_4 -алкил,
 R_3 - водород или C_1-C_6 -ацил,
 * - L-конфигурация атома углерода,

подвергают обработке хиральной кислотой, разделяют полученные две диастереомерные соли указанного соединения, выделяют из указанной соли катионную часть действием основания и удаляют защитные группы, причем выделение свободного основания проводят либо в виде отдельной стадии до или после удаления защитных групп, либо одновременно с удалением защитных групп, для получения диастереомера N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589}^{25} -21,06^\circ$,

практически не содержащего диастереомера N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589}^{25} +31,09^\circ$ или диастереомера N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидро[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589}^{25} +31,09^\circ$, практически не содержащего диастереомера N-{4-[2-(2-амино-4-гидрокси-5,6,7,8-тетрагидропиридо[2,3-d]пиримидин-6-ил)этил]бензоил}-L-глутаминовой кислоты со значением $[\alpha]_{589}^{25} -21,06^\circ$ или перевод в соль действием основания.

Т а б л и ц а 1

Соединение	Доза, мг/кг	Ингибирование, %	Выживание
Смесь изомеров А и В	1,60	5	9/9
	3,12	12	9/9
	6,25	13	9/9
	12,50	50	9/9
Изомер А	1,60	47	9/9
	3,12	24	9/9
	6,25	0	9/9
	12,50	0	9/9
Изомер В	1,60	71	10/10
	3,12	91	10/10
	6,25	98	10/10
	12,50	100	10/10
	25,00	100	10/10
	50,00	100	9/10
	100,00	100	8/10
	200,00	100	6/10

Т а б л и ц а 2

Соединение	Доза, мг/кг	Ингибирование, %	Выживание
Изомер А	6,00	74	10/10
	12,50	89	10/10
	25,00	100	10/10
	50,00	100	10/10
	100,00	100	10/10
Изомер В	3,60	71	10/10
	6,25	84	10/10
	12,50	89	10/10
	25,00	99	10/10
	50,00	100	10/10
	100,00	100	8/10

Т а б л и ц а 3

Доза, мг/кг	Ингибиро- вание, %	Выжива- ние	Показания
0,62	20	5/5	Непрерывное вли-
1,25	59	6/6	вание (2 мл 1 день)
2,50	93	6/6	в 1%-ном NaHCO_3 .
5,00	Отравление	0/6	Ежедневно в тече-
			ние 5 дней
3,60	76	10/10	Внутрибрюшинно
6,25	93	10/10	(0,5 мл/день) в
12,50	99	8/10	Эмульфоре. Ежед-
25,00	100	7/10	невно в течение
50,00	100	8/10	10 дней
100,00	Отравление	0/10	
50	91	10/10	Внутрибрюшинно
100	96	10/10	(0,5 мл/день) в
200	100	10/10	Эмульфоре. Только
400	100	8/10	дни 1,3,5,7 и 9
6,25	39	10/10	Внутрибрюшинно
12,50	21	10/10	(0,6 мл/день) в
25,00	59	10/10	Эмульфоре. Только
50,00	60	10/10	в дни 1,3,5,7 и 9.
100,00	94	10/10	

Т а б л и ц а 4

Доза, мг/кг	Ингибиро- вание, %	Выживание
3,60	62	10/10
6,25	76	7/10
12,50	90	10/10
25,00	99	8/10
50,00	99	7/9
100,00	Отравление	0/10

Составитель В. Волкова

Редактор Н. Гунько

Техред Л. Олийнык

Корректор С. Черни

Заказ 291

Тираж 237

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101