

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 198 695
K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 17 04 78
(21) PV 2467 - 78

(11) (B1)

(51) Int. Cl.¹ C 07 H 15/04

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 30 11 82

(75)

Autor vynálezu ZAORAL MILAN DrSc. ing., JEŽEK JAN a MAŠEK KAREL DrSc. MUDr. doc.,
PRAHA

(54) Způsob přípravy glykopeptidů

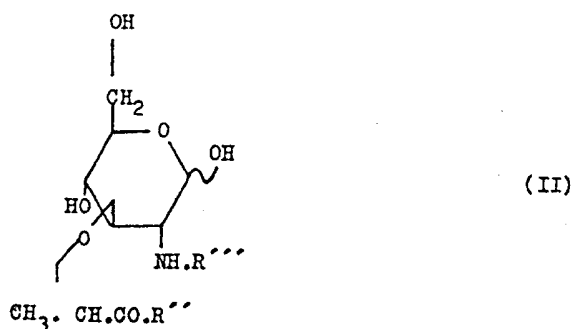
1

Vynález se týká způsobu přípravy glykopeptidových fragmentů bakteriálních stěn.

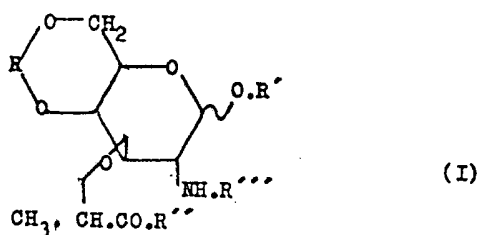
Při syntézách glykopeptidových fragmentů bakteriálních stěn se chrání hydroxylové skupiny v poloze 1 až 4,6 kyseliny N-acetylmuramové především benzylovým a benzyliidenovým zbytkem (Adam A. a spoluprac. NSR 2 450 355; Lanzilotti A.E. a spoluprac. J. Amer. Chem. Soc. 86 (1964) 1880; Chedid L. a spoluprac. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73 (1976) 2472)). Důvody pro tento postup spočívají ve snadné přístupnosti a výhodných vlastnostech kyseliny 1-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramové, která je proto mimořádně vhodnou výchozí látkou pro přípravu příslušných glykopeptidů. Odstraňování benzylové a benzyliidenové ochranné skupiny se provádí katalytickou hydrogenací, v jediném stupni. Nevýhodou této reakce je časová náročnost a choulostivost provedení. Reakce se stává problematickou zejména v přítomnosti funkčních skupin obsahujících prvky působící jako katalytické jedy. Další nevýhodou je vysoká cena katalysátorů paládiové a platinové katalysátory).

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob přípravy glykopeptidů podle tohoto vynálezu, bezného vzorce II,

číslo



v němž R''' je aminoskupina nebo alkylaminový zbytek o počtu uhlíkových atomů 10 - 60 nebo peptidový řetězec obsahující neutrální aminokyseliny glycin, alanin, D-alanin, valin, norvalin, leucin, norleucin a basicke aminokyseliny α , β -diaminopropionovou, α , γ -diaminomáslnou, ornithin, lysin a jeho deriváty a dále kyselinu D-glutamovou a její deriváty a kyselinu meso-diaminopimelovou (α , α') a její deriváty, a R''' znamená zbytek mastné kyseliny o počtu uhlíkových atomů 1 - 4, jehož podstatou je, že se na deriváty a peptidy kyseliny 1-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramové obecného vzorce I,



v němž R znamená benzylidenový nebo substituovaný benzylidenový zbytek, R' je benzylový nebo substituovaný benzylový zbytek, R'' a R''' mají stejný význam, jak uvedeno shora, působí alkalickými kovy, s výhodou sodíkem, v kapalném amoniaku.

Redukce sodíkem v kapalném amoniaku patří k běžným metodám chemie peptidů (Sifferd R. H., du Vigneaud V., J. Biol. Chem. 108 (1935) 753; Houben-Weyl 15/1, Synthese von Peptiden (Ed. E. Wünsch) str. 228. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974). V chemii cukrů se používá této metody málo. Je známo štěpení cukerných benzyleterů, benzylthioeterů, benzylglykosidů a benzylthioglykosidů (McGloskey Ch. M. Adv. Carbohydr. Chem. 12 (1957) 137; Goodman L., Christensen J.E. J. Org. Chem. 29 (1964) 1787; Holick S.A., Anderson L.: Carbohydr. Res. 34, (1974) 208; Reist E. J., Bartuska V. J., Goodman L. J. Org. Chem. 29, (1964) 3725; Freudenberg K., Lautsch W., Piazolo G. Chem. Ber. 74 (1941) 1879; Burke D.C. J. Org. Chem. 20 (1955) 643). Štěpení cukerných acetalů a ketalů sodíkem v kapalném amoniaku není známo, rovněž není známo simultánní odštěpování benzylidenového a acetalového, resp. ketalového zbytku tímto činidlem. Hlavní výhodou odstraňování benzylové a benzylidenové skupiny z cukerných derivátů způsobem podle tohoto vynálezu je metodická jednodušnost, spolehlivost a materiálová a časová nenáročnost. Zatímco katalytická hydrogenace trvá, podle typu látky, 8 - 48 hod., je redukce sodíkem v kapalném amoniaku skončena během několika minut. Výtěžky jsou srovnatelné nebo lepší než u katalytických hydrogenací.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu přípravy glykopeptidů podle vynálezu.

Body tání látek uvedených v příkladech provedení byly stanovovány na elektrickém bloku (Koflerův blok) a nejsou korigované. Stanovování optické aktivity bylo prováděno na objektivním polarimetru (Perkin Elmer typ 141). Infračervená spektra byla měřena na spektrofotometru (UR 20, Zeiss Jena, NDR). Chromatografie v tenké vrstvě byly prováděny na silikagelových vrstvách nanesených na hliníkové fólii (Silufol, Kavalier, Votice) a na skleněných deskách (DG-Fertigplatten Kieselgel 60, Merck, NSR) v soustavách n-butanol-kyselina octová-voda (4:1:5, S_1), (4:1:1, S_2), n-butanol-kyselina octová-pyridin-voda (30:6:24:20, S_3), octan etylnatý-kyselina octová-pyridin-voda (5:1:5:3, S_4), (5:5:5:3, S_5). Chromatografie na hliníkové fólii byly prováděny po dobu 1 h, na skleněných deskách 8 h. K detekci látek na chromatogramech bylo používáno chlor-tolidinového činidla (Reindel F., Hoppe W. Chem. Ber. 87 (1954) 1103; Brenner M., Zimmermann J.P., Wehrmüller J., Quitt P., Hartmann A., Schneider W., Beglinger V. Helv. Chim. Acta 40 (1967) 1499). Při redukcích bylo používáno kapalného amoniaku, čerstvě předestilovaného se sodíkem.

Příklad 1

Amid N-acetylmuramylalaninu

K roztoku 541,6 mg (1 mmol) amidu 1- α -O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramylalaninu v 500 ml kapalného amoniaku byl přidáván po malých částech sodík do vzniku tmavomodrého zbarvení stálého 30 s. Rostok byl odbarven přidáním několika kapek kyseliny octové a odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl zbaven zbytků amoniaku hodinovým evakuováním (vodní vývěva) při teplotě místnosti, byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody a míchán 1 h. se 40 ml silně kyselého iontoměníče (Dowex 50W X4, 50 mesh). Iontoměníč byl odfiltrován a filtráty byly mrazově sublimovány. Bylo získáno 290 mg lyofilisátu jednotného při chromatografii v tenké vrstvě (silikagel na skleněné desce) v soustavách S_1 a S_2 . $[\alpha]_D^{20} + 32,6^\circ$ (c 0,2, voda), po 21 h + $29,4^\circ$. Pro $C_{14}H_{25}N_3O_8 \cdot H_2O$ (381,4) vypočteno: 44,09 % C, 7,14 % H, 11,02 % N; nalezeno: 44,19 % C, 7,12 % H, 10,71 % N. Analýza aminokyselinného složení: Mur 0,99, Ala 1,0. Infračervené spektrum (KBr tableta): Amid I 1663 cm^{-1} , amid II 1548 cm^{-1} , $-CO.NH_2(CO)$ 1700 cm^{-1} , $-O-$ 1121-1055 cm^{-1} .

Příklad 2

Amid N-acetylmuramyl-alanyl-D-isoglutaminy- N - acetyllysyl-D-alaninu

Redukce a zpracování reakční směsi bylo provedeno stejným způsobem jako v příkladu 1. Z 450 mg (0,49 mmol) amidu 1- α -O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramylalanyl-D-isoglutaminy-N-acetyllysyl-D-alaninu (1000 ml kapalného amoniaku) byl získán produkt (lyofilisát) chromatograficky jednotný při chromatografii v tenké vrstvě (silikagel na skleněné desce) v soustavách S_2 a S_3 . Lyofilisát byl sušen 3 dny ve vakuu nad kyslíčnickem fosforečným a hydroxidem draselným za teploty místnosti. Výtěžek 275 mg. Pro $C_{30}H_{52}N_8O_{13}$ (732,8) vypočteno 15,29 % N; nalezeno 14,25 % N. Obsah peptidu v lyofilisátu činí 93 %. Výtěžek (přečtený obsah peptidu) 71 % . $[\alpha]_D^{20} + 25,5^\circ$ (c 0,25, voda - dimethylformamid

3:2). Pro $C_{30}H_{52}N_8O_{13} \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$ (810,9) vypočteno 47,40 % C, 7,21 % N; nalezeno 47,66 % C, 6,99 % H, 13,78 % N. Analýza aminokyselinového složení: Mur 1,05, Ala₂ 1,98, Glu 1,06, Lys 0,95. Infračervené spektrum (KBr tableta): Amid I 1661 cm^{-1} , amid II 1550 a 1539 cm^{-1} , $-CO.NH_2$ (CO) inflex 1700 cm^{-1} , $-O-1119$ a 1054 cm^{-1} .

Příklad 3

Diamidy kyseliny N-acetylmuramylalanyl-D-glutamové

Redukce monohydrátu diamidu kyseliny 1- α -O-benzyl-4,6-benzyliden-N-acetylmuramylalanyl-D-glutamové (500 mg, 0,73 mmol) v 1200 ml kapalného amoniaku a zpracování reakční směsi bylo provedeno stejným způsobem jako v předchozích příkladech. Bylo získáno 323,7 mg lyofilisátu. Chromatografie v tenko vrstvě (silikagel na skleněné desce, S₂) ukázala přítomnost intenzivní skvrny hlavního produktu a skvrnu minoritního produktu v blízkosti startu. Lyofilisát byl rozpuštěn ve 2 ml soustavy S₂ a nanesen na sloupec silikagelu (1,7 x 75 cm, 60 - 120) ekvilibrovaný s S₂ a chromatografován v S₂ při rychlosti průtoku 45 ml/h a velikosti frakcí 9 ml. Frakce obsahují čistý produkt (47-86) byly spojeny, odpařeny za sníženého tlaku, organická rozpouštědla byla odstraněna opakovaným odpařováním s vodou ve vakuu (40 °C, a 50 ml H₂O, 2x). Odparek byl rozpuštěn v 30 ml vody a lyofilisován. Lyofilisát (jednotný při chromatografii v tenké vrstvě silikagelu na hliníkové fólii v soustavách S₁, S₂, S₃) byl sušen 3 dny ve vakuu nad kysličníkem fosforečným a hydroxidem draselným. Výtěžek 308 mg. Pro $C_{19}H_{33}N_5O_{10}$ (491,5) vypočteno 14,25 % N; nalezeno 13,01 % N. Obsah peptidu v lyofilisátu odpovídá 91 %. Výtěžek 78 % (přepočteno na obsah peptidu v lyofilisátu). $[\alpha]_D^{20} + 21,8^\circ$ (c 0,5, voda). Pro $C_{19}H_{33}N_5O_{10} \cdot \frac{1}{2} CH_3COOH \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (548,55) vypočteno 43,79 % C, 6,98 % H, 12,76 % N; nalezeno 43,72 % C, 6,71 % H, 12,72 % N. Analýza aminokyselinového složení: Mur 0,97, Ala 0,99, Glu 1,01. Infračervené spektrum (KBr tableta): Amid I 1663 cm^{-1} , amid II 1550 cm^{-1} , $-CO.NH_2$ (CO) inflex 1700 cm^{-1} , $-O-1120$ a 1050 cm^{-1} .

Příklad 4

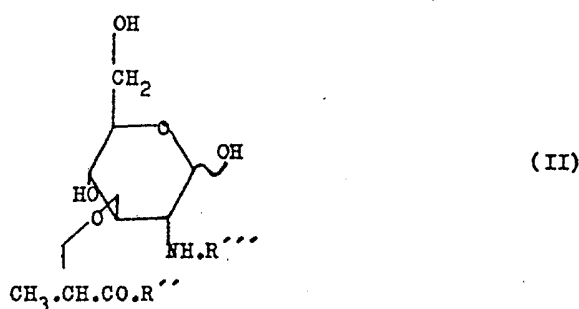
N-Acetylmuramylalanyl-D-isoglutamin

K roztoku 105 mg sodíku v 500 ml kapalného amoniaku bylo přidáno za míchání 340 mg (0,445 mmol) benzylesteru 1- α -O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramylalanyl-D-isoglutaminu. Reakční směs byla po 30 s odbarvena přidávkou kyseliny octové. Zpracování reakční směsi bylo provedeno stejným způsobem jako v předchozích příkladech. Bylo získáno 225 mg lyofilisátu. Chromatografie v tenké vrstvě (na vrstvě silikagelu na hliníkové fólii S₂) ukázala přítomnost intenzivní skvrny hlavního produktu a dvou slabých skvrn vedlejších produktů. Lyofilisát byl vyčištěn chromatografií na silikagelu stejným způsobem, jak bylo popsáno v předchozím příkladu (kolona 1,7 x 100 cm, rychlost průtoku 55 ml/h, velikost frakcí 9 ml; produkt byl obsažen ve frakcích 31-49). Výtěžek 187 mg lyofilisátu jednotného při chromatografii v tenké vrstvě silikagelu na hliníkové fólii (S₁, S₂, S₃). Pro $C_{19}H_{32}N_4O_{11}$ (492,5) vypočteno 11,38 % N; nalezeno 8,92 % N. Obsah peptidu v lyofilisátu

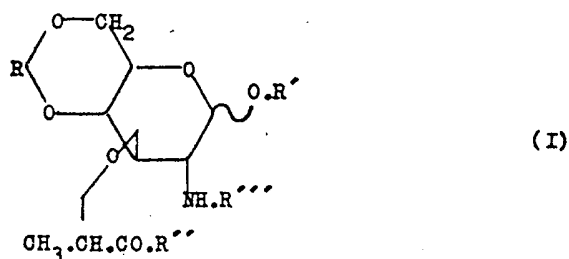
78,5 %. Výtěžek 67 % (přepočteno na obsah peptidu v lyofilisátu). $[\alpha]_D^{20} + 35,3^\circ$ (c 0,8, voda), po 24 hod. + 32,1°. Pro $C_{19}H_{32}N_4O_{11} \cdot CH_3COOH \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (561,5) vypočteno 44,92 % C, 6,64 % H, 9,98 % N; nalezeno 44,79 % C, 6,58 % H, 9,68 % N. Analýza aminokyselinového složení: Mur 0,83, Ala 1,02, Glu 0,98. Infračervené spektrum (KBr tableta): Amid I 1661 cm^{-1} , amid II 1550 cm^{-1} , $-CO.NH_2$ (CO) 1698 cm^{-1} , $-O-$ 1119 a 1054 cm^{-1} . Literatura (Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K., Shiba T. Bull. Chem. Soc. (Japan) 49 (1976) 533) uvádí $[\alpha]_D^{15} + 36,9^\circ$ (c 0,5, voda), po 25 h + 33,1° (pro produkt obsahující $\frac{1}{4} H_2O$).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy glykopeptidů obecného vzorce II,



v němž R'' je aminoskupina nebo alkylaminový zbytek o počtu uhlíkových atomů 10 až 60 nebo peptidový řetězec obsahující neutrální aminokyseliny glycin, alanin, D-alanin, valin, norvalin, leucin, norleucin a basické aminokyseliny α, β -diaminopropionovou, α, γ -diaminomáselnou, ornithin, lysin a jeho deriváty a dále kyselinu D-glutamovou a její deriváty a kyselinu meso-diaminopimelovou (α, α') a její deriváty, a R''' znamená zbytek mastné kyseliny o počtu uhlíkových atomů 1 - 4, vyznačující se tím, že se na deriváty a peptidy kyseliny 1-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-N-acetylmuramové obecného vzorce I,



O P R A V A

Popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 198 695

Int. Cl.³ C 07 H 15/04

V popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 198 695 je neúplná definice vynálezu.

Za chemickým vzorcem I /následuje/ :

... v němž R znamená benzylidenový nebo substituovaný benzylidenový zbytek, R' je benzylový nebo substituovaný benzylový zbytek a R'' a R''' mají stejný význam jak uvedeno shora, působí alkalickými kovy, s výhodou sodíkem, v kapalném amoniaku.

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY