PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

277 752

ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

(21) Číslo přihlášky: **6981-88**

(22) Přihlášeno: 21. 10. 88

(40) Zveřejněno: 16. 12. 92

(47) Uděleno: 24. 02. 93

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14. 04. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[5]:
C 07 C 229/02

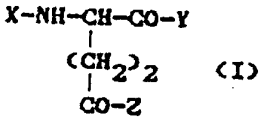
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(73) Majitel patentu:
Léčiva, s. p., Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:
Flegel Martin RNDr. CSc., Praha, CZ;
Vrba Tomáš ing., Praha, CZ;
Charvátová Jana RNDr., Praha, CZ;
Geisler Adolf ing., Praha, CZ;
Krojidlo Milan CSc., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:
Adamantyl-1-amid deriváty glutamové kyseliny

(57) Anotace:
Nové adamantyl-1-amid deriváty glutamové kyseliny, použitelné pro přípravu nových biologicky účinných látek. Mají vzorec I, kde značí X skupiny typu benzyloxykarbonyl, tercbutyloxykarbonyl, o-nitrofenylthienyl, fluorenylmetyloxykarbonyl nebo vodík, Y benzylovou, tercbutylovou, n-butylovou, amidovou, hydroxylovou nebo adamantyl-1-amidovou skupinu, Z pentafluorfenylovou, adamantyl-1-amidovou nebo amidovou skupinu, přičemž v kombinaci skupin X, Y a Z musí být u všech derivátů buď v místě Y nebo Z nebo u obou skupin Y a Z přítomna adamantyl-1-amidová skupina.

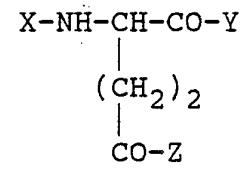


(I)

CZ 277 752 B6

Oblast techniky

Vynález se týká adamantyl-1-amid derivátů glutamové kyseliny obecného vzorce



(I).

kde značí X skupiny benzyloxykarbonyl, terc-butyloxykarbonyl, o-nitrofenylthienyl, fluorenylmetyloxykarbonyl nebo vodík.
Y skupiny benzylovou, terc-butylovou, n-butylovou, amidovou, hydroxylovou nebo adamantyl-1-amidovou.
Z skupiny pentafluorfenylovou, adamantyl-1-amidovou nebo amidovou.
přičemž v kombinaci skupin X, Y a Z musí být u všech derivátů buď v místě Y nebo Z nebo obou skupin Y a Z přítomna adamantyl-1-amidová skupina.

Dosavadní stav techniky

Tyto deriváty jsou syntetizovány jako meziprodukty pro biologicky aktivní peptidy - fragmenty bakterielních stěn, jako je například N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (MDP) a jeho desmuramylanolog adamantyl-1-amid L-alanyl-D-isoglutaminu, který má význačnou imunomodulační a imunostimulační aktivitu (čs. AO 231221).

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v přípravě nových adamantyl-1-amid derivátů glutamové kyseliny obecného vzorce I.

Látky podle vynálezu se připravují tak, že se vnitřní anhydrid terc-butyloxykarbonyl-glutamové kyseliny připravený upraveným postupem (Schroeder E., Kliegel E., Justus Liebigs Ann. Chem. 673. 196/1964) ponechá - jak bylo autory vynálezu zjištěno - bez isolace kondensovat s příslušným alkoholem, amoniakem nebo adamantyl-1-amidem. Derivát s modifikovanou α-karboxylovou skupinou nebo jeho dicyklohexylaminová či aminoadamantanová sůl se pak jednoduše převede reakcí se substituovaným fenolem na tzv. aktivní ester. Jeho reakcí s adamantyl-1-amidem nebo amoniakem se pak získá odpovídající amid na karboxylové skupině v postranním řetězci glutamové kyseliny.

Autoři vynálezu prokázali, že převedení γ-karboxylové skupiny na aktivní ester je výhodné, neboť při přímé reakci volné karboxylové skupiny tvoří adamantyl-1-amin snadno s deriváty aminokyselin soli obtížně rozpustné v běžných organických rozpouštědlech. Vyloučené soli pak jinak komplikují reakční průběh a snižuje se tak výtěžek adamantyl-1-amid derivátů. Tyto soli se však dají s výhodou využít pro charakterizaci jinak obtížně krystalizujících derivátů aminokyselin.

Přímou reakcí vnitřního anhydridu terc-butyloxykarbonylglutamové kyseliny s amoniakem byl také

získán ve větším množství jinak obtížně přístupný derivát isoglutaminu, který se dosud připravoval podle Zaoral M., Straka R. (Coll. Czech. Chem. Commun. 42. 560/1977).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

t-butyloxykarbonyl-D-isoglutamin (A)
anhydrid t-butyloxykarbonyl-D-glutamové kyseliny (B)

65 g (0,26 mol) Boc-D-Glu bylo rozpuštěno ve 130 ml suš. tetrahydrofuranu a roztok byl ochlazen na 0 °C. Po přidání 62 g dicyklohexylkarbodiimidu rozpuštěného ve 130 ml tetrahydrofuranu byla reakční směs míchána 5 hodin při teplotě místnosti a pak ponechána v lednici přes noc. Druhý den byla vyloučená dicyklohexylmočovina odfiltrována. Filtrát obsahující anhydrid (B) byl ochlazen na -40 °C, bylo přilito 250 ml chloroformu a po ochlazení na -50 °C bylo za intenzivního míchání k reakční směsi přilito 250 ml vysušeného kapalného amoniaku. Po 30 minutách byla suspenze uložena do lednice, kde byla ponechána do druhého dne. Produkt byl odfiltrován a vysušen v exsikátoru nad P_2O_5.

Bylo získáno 63,5 g (86% teor.) odpovídající amonné soli. 36,5 g soli bylo pak převedeno na terc-butyloxykarbonyl-D-isoglutamin 1M kyselinou sírovou. Bylo použito 240 ml 1M kyseliny sírové, kterou byla extrahována suspenze amonné soli v etylacetátu. Isoglutaminový derivát vykrystaloval přímo z etylacetátového roztoku.

Bylo získáno 22 g (64,5% teor.) produktu (A), o t.t. 153,6 °C, homogenní při chromatografii v tenké vrstvě (Kieselgel 60) n-butanol, kyselina octová, voda (4:1:1), R_f=0,85.

Příklad 2

D-isoglutamin

Z 22 g terc-butyloxykarbonyl-D-isoglutaminu (0,09 mol) byla odštěpena chránící skupina pomocí 140 mol 50% hmot. kyseliny trifluoroctové v 70 ml metylenchloridu. Produkt byl izolován ionexovou chromatogafií na silně kyselém katexu. K eluci byl použit 10% hmot. roztok pyridinu ve vodě. Po odpaření byl odparek rozetřen s éterem, odfiltrován a vysušen v exsikátoru nad P_2O_5/KOH.

Bylo získáno 11 g (84% teor.) produktu ve shodě s publikovanými údaji (Zaoral M., Straka R.: Coll. Czech. Chem. Commun. 42, 560/1977).

Příklad 3

Boc-D-Glu-OBzl/DCHA

50 g Boc-D-Glu (202 mmol) bylo rozpuštěno ve 100 ml THF za míchání vibračním míchadlem. Roztok byl ochlazen směsí led-voda na cca +3 °C. Poté byl přidán roztok 54 g DCCI ve 100 ml THF a směs byla míchána 4 hodiny při +5 °C.

Reakční směs byla ponechána přes noc při teplotě 0 °C. Vyloučená DCHM byla odfiltrována a promyta THF. Do filtrátu bylo přidáno 70 ml suchého benzylalkoholu (675 mmol). Za stálého míchání vibračním míchadlem byl ke směsi přikapáván roztok 60 ml

dicyklohexylaminu (306 mmol) v 1200 ml sušeného éteru. Reakční směs byla míchána 4 hodiny. Po stání přes noc při teplotě 0 °C byl produkt odfiltrován, promyt éterem a sušen volně při teplotě 18 až 25 °C.

Bylo získáno 75 g (72% teor.) produktu, t.t. 169 °C.

Příklad 4

Boc-D-Glu-OBzl
(Uvolnění z dicyklohexylamonné soli)

36,5 g (70,4 mmol) Boc-D-Glu-OBzl/DCHA/ bylo suspendováno v 550 ml etylacetátu. Suspenze byla 3x protřepána nasyceným roztokem $NaHSO_4$. Etylacetátová vrstva byla vysušena síranem sodným, etylacetát byl odpařen. Olejovitý odparek byl naočkován, převrstven petroleterem a uložen přes noc při 0 °C. Bylo získáno 21,6 g (91% teor.) produktu, t.t. 88 °C.

Příklad 5

Boc-D-Glu-OBzl/OPfp/

7,55 g Boc-D-Glu-OBzl (22,4 mmol) bylo rozpuštěno za míchání v 70 ml chloroformu. Roztok byl vychlazen na +4 °C, bylo přidáno 4,44 g (24,12 mmol) pentafluorfenolu a roztok 4,81 g DCCI (23,31 mmol) ve 30 ml chloroformu. Reakční směs byla míchána při +4 °C 5 hodin.

Po stání přes noc při teplotě 0 °C byla odfiltrována DCHM a filtrát byl odpařen. Olejovitý odparek byl naočkován a převrstven petroleterem. Vyloučený produkt byl odfiltrován, promyt petroleterem a vysušen v exsikátoru nad P_2O_5/KOH.

Bylo získáno 9,77 g (86 % teor.) produktu, t.t. 96 až 97 °C.

Příklad 6

Boc-D-Glu-OnBu/DCHA/
Dicyklohexylamonná sůl n-butylesteru
terc-butyloxykarbonyl-D-glutamové kyseliny

40,1 g (0,16 mol) Boc-D-Glu bylo za míchání rozpuštěno ve 100 ml THF. Roztok byl ochlazen na 10 °C a po částech byl přidáván roztok 38 g (0,18 mol) DCCI v 50 ml THF. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti 2 hodiny a ponechána přes noc při +4 °C. Dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, promyta 100 ml THF a spojené filtráty byly zahuštěny na polovinu původního objemu na vakuové odparce. Poté bylo k tomuto roztoku anhydridu v THF přidáno 200 ml destilovaného n-butanolu. K reakční směsi byl pak za míchání přikapáván roztok 50 ml DCHA v 500 ml éteru. Směs byla míchána při teplotě místnosti a pak přes noc při +4 °C. Krystalický produkt byl odfiltrován, promyt éterem a vysušen.

Bylo získáno 28 g produktu, (36% teor.), t.t. 168 °C.

Příklad 7

Boc-D-Gln-OnBu
n-butylester terc-butyloxykarbonyl-D-glutaminu

20 g (0,05 mol) dicyklohexylamonné sole bylo uvolněno a převedeno na kyselinu. K 6 g (0,014 mol) Boc-D-Glu-OnBu, rozpuštěno v 70 ml DMF bylo přidáno 3,2 ml (0,023 mol) TEA a po

ochlazení na -30 °C bylo přikapáno 4,25 ml (0,032 mol) chloromravenčanu sec.butylnatého. Směs byla míchána 3 minuty při -5 °C. Po ochlazení na -30 °C pak bylo přidáno 10 ml 20% hmot. NH_3 v $CHCl_3$. Baňka byla pevně uzavřena a uložena přes noc v lednici. DMF byl odpařen, odparek rozpuštěn v etylacetátu a vytřepán 2 x 50 ml $NaHCO_3$. Etylacetátová vrstva byla vysušena a rozpouštědlo oddestilováno. K odparku byl přilit petroleter a produkt byl ponechán při +4 °C vykrystalovat.

Bylo získáno 5,3 g (80 % teor.) krystalického produktu, t.t. 76 až 80 °C.

Příklad 8

Boc-D-Glu-OBzl/NH-Ad/

15 (30 mmol) Boc-D-Glu-OBzl/OPfp/ bylo rozpuštěno v 70 ml chloroformu, k roztoku bylo přidáno 4,6 g (30 mmol) 1-aminoadamantanu a reakční směs byla míchána při teplotě místnosti 6 hodin pod chlorkalciovým uzávěrem. Po stání přes noc při 0 °C byl odpařen chloroform. Hustý viskozní olej byl rozpuštěn ve 370 ml etylacetátu a vytřepán 200 ml nasyceného roztoku $NaHSO_4$. Organická vrstva obsahující produkt byla 3x protřepána nasyceným roztokem $NaHCO_3$, vysušena bezvodým Na_2SO_4 a odpařena. Olej byl převrstven n-hexanem, naočkován a uložen na 2 hodiny při teplotě -20 °C. Pak byl produkt odfiltrován, promyt n-hexanem a sušen v evakuovaném exsikátoru nad P_2O_5/KOH.

Bylo získáno 12,2 g /87% teor.) produktu, s t.t. 120 až 123 °C, chromatograficky jednotného.

Příklad 9

Boc-D-Glu-NH-Ad

K roztoku anhydridu terc-butyloxykarbonyl-D-glutamové kyseliny, který byl připraven již uvedeným postupem (viz příklad 1) z 2 g Boc-D-Glu, byl přilit při teplotě -5 °C roztok 1,5 g 1-aminoadamantanu v 15 ml THF. Prakticky ihned se vyloučil gelovitý produkt. Reakční směs byla míchána 2 hodiny. Produkt byl odfiltrován, promyt směsí éteru a petroleteru a vysušen.

Byly získány 2 g látky (1-aminoadamantanové soli Boc-D-Glu-NH-Ad), která byla suspendována ve 25 ml etylacetátu. K suspenzi bylo přilito 20 ml 0,5N kyseliny chlorovodíkové. Suspenze byla opakovaně protřepána roztokem HCl a vodou a etylacetátový roztok byl pak vysušen a odpařen.
Bylo získáno 1,5 g produktu (47% teor.), t.t. 217 až 219 °C.

Příklad 10

Boc-D-Glu-COOH/NH-Ad/

Ve 100 ml metanolu bylo za míchání rozpuštěno 10 g Boc-D-Glu-OBzl/NH-Ad/ (21,2 mmol). Pak bylo přidáno 0,5 ml HCOOH a reakční směs byla profoukána dusíkem (5 minut). Potom bylo do roztoku přidáno asi 300 mg Pd/C (Fluka). Směs byla za míchání probublávána vodíkem asi 90 minut, pak byla provedena chromatografie v systému toluen, metanol (9:1), R_f produktu = 0,4 (detekce chloračně). Po odfiltrování katalyzátoru byl metanol

odpařen. Pevný krystalický odparek byl rekrystalizován z etanolu a vody. Po stání přes noc při 0 °C byl produkt odfiltrován, promyt destilovanou vodou a éterem a sušen v evakuovaném exsikátoru nad P_2O_5/KOH.

Bylo získáno 6,5 g (80,4 % teor.) látky, t.t. 192 °C.

Příklad 11

Boc-D-Glu-NH_2/NH-Ad/

11,9 g (25 mmol) Boc-D-Glu-OBzl/NH-Ad/ bylo rozpuštěno ve 230 ml abs. metanolu, metanolický roztok byl sycen amoniakem 40 minut. Baňka s produktem byla uzavřena a odstavena při teplotě místnosti 3 dny. Metanol byl odpařen a vzniklý olej byl rozpuštěn za horka v minimálním objemu etylacetátu. K roztoku byl přidán po malých částech petroleter a produkt byl uložen do lednice. Po stání přes noc při 0 °C byly krystaly odfiltrovány, promyty petroleterem a sušeny v exsikátoru nad P_2O_5/KOH.

Bylo získáno 8,85 g produktu (89 % teor.), t.t. 165 °C.

Průmyslová využitelnost

Nové adamantyl-1-amid deriváty glutamové kyseliny jsou použitelné pro přípravu biologicky aktivních peptidů například s imunomodulačním a imunostimulačním účinkem.
V textové části jsou používány následující zkratky a symboly:

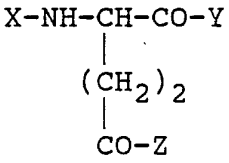
NH-Ad	adamantyl-1-amid
DMF	dimetylformamid
Boc	terc-butyloxykarbonyl
Glu	kyselina glutamová
DCHM	dicyklohexylmočovina
DCHA	dicyklohexylamin
THF	tetrahydrofuran
DCCI	dicyklohexylkarbodiimid
Bzl	benzyl
Pfp	pentafluorfenyl
n-Bu	n-butyl
$NaHSO_4$	hydrogensíran sodný
Na_2SO_4	síran sodný
P_2O_5	oxid fosforečný
KOH	hydroxid sodný
$CHCl_3$	trichlormetan
$NaHCO_3$	hydrogenuhličitan sodný
HCL	kyselina chlorovodíková
HCOOH	kyselina mravenčí
Pd/C	palladium/aktivní uhlí
OnBu	n-butyloxy-
OBzl	benzyloxy-

LÁTKA	TEPLOTA TÁNÍ		CHROMATOGRAFIE V TENKÉ VRSTVĚ SILIKAGELU		
			SOUSTAVA	R_F	DETEKCE
BOC-D-iGlm	153° C		n- BuOHO : AcOH : H_2O	0.85	N
D-iGlm		-21 (Cl, H_2O)	4 : 1 : 1		
BOC-DGlu-OBzl (DCHA)	169° C	-11.6 (C_1, MeOH)	toluen : MeOH	0.2	N
			9 : 1		
BOC-DGlu-OBzl	88° C	+ 5.2 (C_1, AcOH)	toluen : MeOH	0.23	N
			9 : 1		
BOC-DGlu-OBzl (OPfp)	96° C	+20.5 (C 0.98, MeOH)	toluen : MeOH	0.6	N
			9 : 1		
BOC-DGlu-nBu (DCHA)	168° C	-10 (Cl, MeOH)	MeOH : $CHCl_3$		N
			9 : 1		
BOC-DGlu-$(NH)_2$-nBu	76° C	+ 3 (C 0,3, DMF)			
BOC-DGlu-OBzl (NHAd)	120° C	+0,3 (C 0,3, DMF)	toluen : MeOH	0.3	N/Cl
			9 : 1		
BOC-DGlu-NHAd	217° C	+18.6 (C 0,3, MeOH)			N/Cl
BOC-DGlu-COOH (NHAd)	192° C	+1,33 (C 0,3, DMF)	toluen : MeOH	0.2	N/Cl
			9 : 1		

CZ 277752 B6

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Adamantyl-1-amid deriváty glutamové kyseliny obecného vzorce



(I).

kde značí X skupiny benzyloxykarbonyl, terc-butyloxykarbonyl, o-nitrofenylthienyl, fluorenylmetyloxykarbonyl nebo vodík.

Y benzylovou, terc-butylovou, n-butylovou, amidovou, hydroxylovou nebo adamantyl-1-amidovou skupinu.

Z pentafluorfenylovou, adamantyl-1-amidovou nebo amidovou skupinu.

přičemž v kombinaci skupin X,Y a Z musí být u všech derivátů buď v místě Y nebo Z nebo obou skupin Y a Z přítomna adamantyl-1-amidová skupina.

Konec dokumentu