



Patent dodatkowy
do patentu nr 48 665

Zgłoszono: 07. X. 1963 (P 102 702)

Pierwszeństwo. 12. X. 1962 Szwajcaria

Opublikowano: 15. IX. 1966

Kl. 12 q 6/01

MKP C 07 c

103/52

UKD

Współtwórcy wynalazku: Peter Quitt, Karl Vogler

Właściciel patentu: F. Hoffmann — La ROCHE & Co. Aktiengesellschaft, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania peptydów

1

Przedmiotem patentu nr. 48 665 jest sposób wytwarzania peptydów o ogólnym wzorze 1, w którym n_1 i n_2 oznaczają liczby 0 lub 1, X oznacza grupę hydroksylową, alkoksylową, aminową, jednoalkiloaminową, dwualkiloaminową lub hydrazynową, a każdy z symboli R oznacza resztę kwasu α -amino-karboksyłowego uwolnioną od grupy α -aminowej i karboksylowej, przy czym conajmniej jedna reszta R zawiera grupę aminową i przynajmniej jedna grupa aminowa cząsteczki zawiera resztę acylową długołańcuchowego nasyconego lub nienasyconego alifatycznego kwasu karboksylowego lub symbol X oznacza resztę jednoalkiloaminową lub dwualkiloaminową mającą podstawnik alkilowy o długim łańcuchu, oraz addycyjnych soli kwasowych tych związków.

Te peptydy i ich addycyjne sole kwasowe odznaczają się aktywnością wobec chorobotwórczych i niechorobotwórczych mikroorganizmów jak gram-dodatnie i gramujemne bakterie oraz drożdże. Związki są bardzo mało toksyczne. Rozkładają się one działaniem proteolitycznych enzymów, przy czym tworzą produkty rozkładu, które nie przejawiają żadnego działania antybakteryjnego. Dlatego związki te mogą być stosowane jako środki konserwujące, na przykład w przemyśle spożywczym i paszowym, jak również jako środki dezynfekcyjne do celów lekarskich i nielekarskich. Można je stosować w postaci roztworów wodnych nalewek lub maści.

2

Stwierdzono, że peptydy o wzorze 1, które zawierają zamiast wymienionych reszt acylowych, o długich łańcuchach reszty alkoksylkarbonyłowe lub alkenyloksylkarbonyłowe o długich łańcuchach wykazują takie same właściwości i z tego względu mogą również znaleźć zastosowanie jako środki konserwujące i dezynfekcyjne. Stwierdzono dalej, że te pochodne N-alkoksylkarbonyłowe lub N-alkenyloksylkarbonyłowe wykazują również częściowo działanie kokcydiostatyczne i odpowiednio mogą znaleźć zastosowanie do zapobiegania, hamowania i leczenia koksydiozy. Te nowe peptydy mogą być otrzymywane sposobem podanym w opisie patentowym nr 48 665.

Wynalazek dotyczy więc sposobu otrzymywania peptydów o wzorze 1, w którym n_1 , n_2 , X i R mają wyżej podane znaczenie i przy czym conajmniej jedna grupa aminowa cząsteczki zawiera długołańcuchową resztę alkiloksylkarbonyłową lub alkenyloksylkarbonyłową, polegającego na tym, że związek o ogólnym wzorze 2 poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze 3, przy czym w tych wzorach a, b, c i d oznaczają liczby 0 lub 1, a suma tych liczb wynosi 0, 1 lub 2, Y oznacza atom chlorowca, grupę hydroksylową lub resztę N_3 kwasu azotowodorowego ewentualnie znitrowaną grupę fenoksylową, grupę fenylomerkapto- lub resztę bezwódnika z nieorganicznym lub organicznym kwasem, X' oznacza grupę alkoksylową, aminową, monoalkiloaminową, dwualkiloaminową lub hydro-

ksylową w postaci soli z zasadą nieorganiczną lub z trzeciorzędową zasadą organiczną, a każdy z symboli R oznacza resztę kwasu α -aminokarboksylowego uwolnioną od grupy α -aminowej i karboksylowej, przy czym conajmniej jedna reszta R zawiera grupę aminową, a poza tym wszystkie znajdujące się w związkach o wzorach 2 i 3 grupy aminowe, z wyjątkiem grupy α -aminowej znajdującej się we wzorze 3 na lewym końcu łańcucha grupy, są chronione przez odszczepialne grupy ochronne i/lub reszty alkoksycarbonylowe lub alkenyloksycarbonylowe o długich łańcuchach, przy czym odszczepia się HY i otrzymuje się dwu-, trój- i cztero-peptyd o ogólnym wzorze 4, w którym R i X mają wyżej podane znaczenie, n_1 i n_2 oznaczają liczbę 0 lub 1, a wszystkie znajdujące się w cząsteczce grupy aminowe są chronione jak wyżej.

Otrzymane peptydy, w których żadna z grup aminowych nie zawiera o długich łańcuchach reszt alkoksycarbonylowych lub alkenyloksycarbonylowych przez wymianę selektywnie odszczepialnych grup ochronnych na przynajmniej jedną tego rodzaju resztę, przeprowadza się w peptydy podstawione przez długołańcuchowe grupy N-alkoksycarbonylowe lub alkenyloksycarbonylowe. Otrzymany produkt przeprowadza się ewentualnie w hydrazyd, i z uzyskanego peptydu odszczepia się nadające się do odszczepienia grupy ochronne, a otrzymane związki ewentualnie przeprowadza w addycyjne sole kwasowe.

Korzystnie jest, jeżeli jako związki wyjściowe stosuje się związki o wzorach 2 i 3, w których wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, przy czym związki te stanowią pochodne kwasu α , ω -dwuaminokarboksylowego, a zwłaszcza lizyny.

Peptydy o wzorze 1 są dwu-, trój- i cztero-peptydami, które są zbudowane z kwasów połączonych przez grupę α -aminową. Przynajmniej jeden z tych kwasów aminowych jest zasadowym kwasem α -aminokarboksylowym, to znaczy takim kwasem α -aminokarboksylowym, który prócz grupy α -aminowej zawiera jeszcze dalszą grupę zasadową (taką jak NH_2 lub $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{NH}_2$). Przykładami takich aminokwasów są: lizyna, arginina, ornityna, kwas α , γ -dwuaminomasłowy i α , β -dwuaminopropionowy. Przykładami niezasadowych kwasów α -aminokarboksylowych są: seryna, fenylalanina, tyrozyna lub leucyna.

Z uwagi na łatwość wytwarzania najkorzystniejsze są dwupeptydy, zaś ze względów fizjologicznych korzystnie jest wytwarzać peptydy zawierające endogenne aminokwasy, a zwłaszcza L-lizynę. Oznaczona między innymi symbolem X grupa alkoksylowa jest zwłaszcza niższą grupą alkoksylową, taką jak grupa metoksylowa lub etoksylowa. Długołańcuchowa reszta alkoksycarbonylowa lub alkenyloksycarbonylowa, zawierają w łańcuchu węglowodorowym co najmniej 8, zwłaszcza 8-20, na przykład 12, 14 lub 16 atomów C. Reszty oznaczone symbolami R pochodzą od jednakowych lub różnych kwasów α -aminokarboksylowych.

Materiały wyjściowe o długołańcuchowych grupach N α -alkoksycarbonylowych można na przykład otrzymywać w następujący sposób. Wytworzo-

ne w znany sposób estry kwasu α -izocyjanokarboksylowego o wzorze 5, w którym R ma wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji z długołańcuchowym alkoholem. W analogiczny sposób można również wprowadzić długołańcuchowe grupy alkoksycarbonylowe lub alkenyloksycarbonylowe do uwolnionych grup aminowych również po utworzeniu peptydów. Ponadto można również wprowadzać grupy alkoksycarbonylowe lub alkenyloksycarbonylowe do wolnych grup α -aminowych, działając otrzymanym z fosgenu i alkoholu chlorkiem alkoksycarbonylowym ewentualnie alkenyloksycarbonylowym na α -aminokwas lub peptyd, zawierający wolną grupę α -aminową.

Grupy reaktywne nie biorące udziału w utworzeniu wiązania peptydowego chroni się znanymi w chemii peptydów metodami przed kondensacją. W przypadku grup karboksylowych osiąga się to w prosty sposób przez zastosowanie estrów lub amidów lub przez utworzenie soli z odpowiednimi resztami nieorganicznymi lub z organicznymi zasadami trzeciorzędowymi. Wolne grupy aminowe mogą być na przykład chronione przez przeprowadzenie w odpowiednie pochodne karbобенzoksylowe, na przykład działaniem chlorku karbобенzoksylowego metodą Schotten-Baumann.

Karbобенzoksylową grupę ochronną można po przeprowadzeniu kondensacji ponownie odszczepić drogą katalitycznego uwodornienia. Zawarte już w związku wyjściowym długołańcuchowe grupy N-alkoksycarbonylowe lub N-alkenyloksycarbonylowe działają podczas kondensacji w każdym przypadku również jako grupy ochronne. Dalsza możliwość ochrony grup aminowych polega na przeprowadzeniu w pochodne ftalilowe, na przykład przez ogrzewanie kwasu aminowego lub peptydu z bezwodnikiem kwasu ftalowego. Po kondensacji, po dodaniu hydrazidu i obróbce kwasem solnym następuje uwolnienie grup aminowych. Grupy aminowe mogą być również chronione za pomocą reszty formylowej. W tym celu działa się na kwasy aminowe ewentualnie peptydy kwasem mrówkowym w obecności bezwodnika kwasu octowego.

W przypadku, gdy w cząsteczce są zawarte grupy aminowe chronione tak przez reszty formylowe, jak i przez reszty karbобенzoksylowe można osiągnąć selektywne odszczepienie, na przykład grup karbобенzoksylowych przez katalityczne uwodornienie lub działaniem mieszaniny kwasu bromowodorowego i octowego, które to zabiegi nie działają na grupy formylowe. Możliwe jest jednak również selektywne odszczepianie grupy formylowych na przykład działaniem kwasów mineralnych na zimno, przy czym nie wpływa to na grupy karbобенzoksylowe. W ten sposób możliwe jest również wprowadzenie długołańcuchowych reszt N-alkoksycarbonylowych lub N-alkenyloksycarbonylowych dopiero po przeprowadzeniu kondensacji peptydowej, na przykład drogą reakcji z odpowiednimi chlorkami, takimi jak chlorek cetyloksycarbonylowy.

Poniżej wyjaśniono bliżej kilka sposobów postępowania według wynalazku: Jeżeli jako substancję wyjściową stosuje się związek o wzorze 2, w którym $\text{Y}=\text{OH}$, to znaczy kwas aminokarboksylowy lub dwu- lub trójpeptyd mający na końcu łańcu-

cha wolną grupę karboksylową, wówczas kondensację obu peptydów o wzorach 2 i 3 prowadzi się w obecności środka kondensującego, na przykład dwucykloheksylokarbodwuimidu, lub karbonyldwuimidazolu. Reakcję prowadzi się korzystnie w niskiej temperaturze w rozpuszczalniku takim, jak na przykład chloroform, dwumetyloformamid, ester octowy, przy czym powstający mocznik oddziela się przez odsączenie, peptyd natomiast pozostaje w roztworze i wydziela się go następnie w przesączu.

Peptyd można również wytworzyć przez reakcję azydku kwasowego ($Y=N_3$) z grupą aminową. Azydek otrzymuje się działaniem kwasu azotowego na odpowiedni hydrazyd kwasowy. Reakcję prowadzi się korzystnie w roztworze na przykład w estrze octowym, lub dwumetyloformamidzie, ewentualnie w obecności kwasu octowego w niskiej temperaturze.

Wiązanie peptydowe można uzyskać przez reakcję chlorku kwasowego ($Y=Cl$) z grupą aminową. Celowe jest przy tym stosować jako substancje wyjściowe chlorki kwasów karbobenzoksyaminowych, otrzymane za pomocą chlorku tionylu. Związki te poddaje się reakcji z estrem aminokwasu (X =grupa alkoksylowa) w obecności zasady, podczas ochłodzenia.

Według wynalazku można również stosować syntezę polegającą na tym, że reagującą przy kondensacji peptydu funkcyjna grupa karboksylowa $-COY$ występuje w znanej postaci mieszanego bezwodnika z organicznym lub nieorganicznym kwasem. Proces prowadzi się korzystnie w ten sposób, że związek o wzorze 2, w którym $Y=OH$ traktuje się w obojętnym rozpuszczalniku takim, jak na przykład czterohydrofuran, zasadą, na przykład trójetiloaminą, po czym na utworzoną sól działa się w obniżonej temperaturze estrem kwasu chlorowęgłowego i powstały bezwodnik, bez wydzielania, poddaje się reakcji ze związkiem o wzorze 3, na przykład estrem kwasu aminokarboksylowego (X =grupa alkoksylowa), lub solą sodową kwasu aminokarboksylowego ($X=ONa$).

Jako ester kwasu chlorowęgłowego stosuje się na przykład ester metylowy, etylowy lub trzeciorzędowy butylowy. W celu otrzymania reaktywnych bezwodników stosuje się między innymi również trójtlenek siarki w dwumetyloformamidzie oraz chlorofosforyn dwumetylu ($C_2H_5O/2P-Cl$), lub pirofosforyn czterocetylu ($C_2H_5O/2P-OP/OC_2H_5/2$).

Inna synteza polega na tym, że podstawiona karboksylowa grupa funkcyjna ($-COY$) związku o wzorze 2 występuje jako tak zwany aktywowany ester, na przykład jako ester p-nitrofenylowy. Ten ester otrzymuje się z chronionego kwasu aminokarboksylowego w obecności pirydyny za pomocą siarczyny p-dwunitrofenylowego ($NO_2-C_6H_4-SO-C_6H_4-NO_2$). Przez reakcję z estrem aminokwasu (X' we wzorze 3=grupie alkoksylowej) powstaje w temperaturze pokojowej wiązanie peptydowe. Produkt reakcji oczyszcza się przez krystalizację. Jako aktywowane estry mogą na przykład być stosowane ester p-nitrofenylowy, 3,5-dwunitrofenylowy lub trójnitrofenylowy.

W podanych niżej przykładach stosuje się następujące skróty:

Z =grupa karbobenzoksyłowa o wzorze 6

dab=grupa α , γ -dwuaminobutyrylowa o wzorze 7

liz =grupa lizylowa o wzorze 8

orn=grupa ornitylowa o wzorze 9.

Przykład I. Na—cetyloksykarbonylo— $(Ne-Z)-L-liz-(Ne-Z)-L-liz-OCH_3$.

18,3 g (33,3 mola) Na—cetyloksykarbonylo— $(Ne-Z)-L-liz-OH$ rozpuszcza się w 150 ml czterohydrofuranu i dodaje w temperaturze $-10^\circ C$ 5,4 g (33,3 mola) karbonyldwuimidazolu. Mieszaninę miesza się w ciągu 20 minut w temperaturze $0^\circ C$. Następnie dodaje się 9,8 g (33,3 mmola)

15 $H-(Ne-Z)-L-liz-OCH_3$ w 50 ml absolutnego czterohydrofuranu i miesza się dalej w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowuje się w próżni i pozostałość rozpuszcza w octanie etylu. Roztwór w octanie etylu przemywa się trzykrotnie ln kwasem solnym, dwukrotnie wodą i jeden raz nasyconym roztworem chlorku sodowego, suszy siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Z 26 g pozostałości otrzymuje się po przekrystalizowaniu z mieszaniny octanu etylu i eteru naftowego 15,1 g Na—cetyloksykarbonylo— $(Ne-Z)-L-liz-(Ne-Z)-L-liz-OCH_3$ o temperaturze topnienia po ponownej krystalizacji $105-106^\circ C$; $[\alpha]^{25}_D = -10,1^\circ C$ ($C=1,0$ w metanolu).

25 Na—cetyloksykarbonylo— $L-liz-L-liz-OCH_3$. 2 HCl 15,1 g (18,2 mmola) N-cetyloksykarbonylo— $(Ne-Z)-L-liz-(Ne-Z)-L-liz-OCH_3$ poddaje się hydrogenolizie w 200 ml kwasu octowego z dodatkiem 3,5 g 5% octowego węgla palladowego.

Po pobraniu 930 ml wodoru, dalsze pochłanianie wodoru już nie zachodzi i mieszaninę przesącza się. Po odparowaniu w próżni pozostaje rozpuszczalna w wodzie pozostałość, którą rozpuszcza się w 22 ml mieszaniny 2,3n kwasu solnego i metanolu i następnie odparowuje do suchości. Ze stałej pozostałości po dwukrotnym przekrystalizowaniu otrzymuje się 6,9 g Na—cetyloksykarbonylo— $L-liz-L-liz-OCH_3$. 2 HCl o temperaturze topnienia $190-192^\circ C$; $[\alpha]^{25}_D = -13,3^\circ$ ($C=0,99$ w metanolu).

35 Stosowany jako materiał wyjściowy związek Na—cetyloksykarbonylo— $(Ne-Z)-L-liz-OH$ otrzymuje się w następujący sposób: 121 g (0,5 mmola) alkoholu cetylowego rozpuszcza się w 1000 ml benzenu. Miesząc oddestylowuje się alkohol tak długo, aż ustanie przechodzenie wody. Następnie obniża się temperaturę do $55-60^\circ$ i wprowadza do naczynia reakcyjnego gazowy fosgen uzyskany przez odparowanie 70 ml (co odpowiada 99 g=1 Mol) ciekłego fosgenu. Trwa to około 6 godzin. Następnie oddestylowuje się połowę benzenu, przy czym przez roztwór przepuszcza się słaby strumień azotu. Wolną od fosgenu i kwasu solnego pozostałość uwalnia się jeszcze całkowicie od benzenu, przy czym otrzymuje się około 150 g chlorku cetyloksykarbonylowego.

45 28,0 g (0,1 mola) $(Ne-Z)-L-liz-OH$ dokładnie rozdrabnia się, umieszcza w 120 ml ln łągu sodowego i 50 ml acetonu i do tej mieszaniny dodaje się kroplami w temperaturze około $5^\circ C$, miesząc 30,5 g (0,1 mola) chlorku cetyloksykarbonylowego i 100 ml ln łągu sodowego, co trwa około 35 minut.

65

Mieszaninę miesza się jeszcze w ciągu 20 minut, następnie zakwasza się 3n kwasem solnym wobec czerwieni kongo i ekstrahuje dwukrotnie octanem etylu. Wyciąg w octanie etylu przemywa się 3 razy 1n kwasem solnym, dwa razy wodą i jeden raz nasyconym roztworem chlorku sodowego, suszy siarczanem sodowym i odparowuje w próżni, Z heksanu krystalizuje 41,7 g substancji — o temperaturze topnienia 55–68°C zawierającej jeszcze nieco alkoholu cetylowego. Przekrystalizowanie z mieszaniny eteru i eteru naftowego daje Na—cetyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—OH o temperaturze topnienia 59–69°C; $[\alpha]_D^{25} = +11,6^\circ$ ($C = 0,96$ w chloroformie).

Przykład II. Na—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—NH—NH₂.

31,7 g (0,1 mola) (Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ · HCl rozdrabnia się dokładnie i zawiesza w 300 ml benzenu i azeotropowo uwalnia od wody. Następnie pod chłodnicą podczas mieszania wprowadza się fosgen, tak długo, aż cała zawiesina przejdzie do roztworu (około 5 godzin). Następnie oddestylowuje się 2/3 benzenu w strumieniu azotu, a resztę odparowuje się w próżni. Otrzymuje się 26,4 g estru metylowego kwasu karbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ (α—izolacjanino—δ—karbobenzoksyaminowalerianowego) w postaci oleistej.

Z 400 ml benzenu oddestylowuje się 100 ml i do pozostałości dodaje się 15,1 ml (96 mmola) n-oktanolu. Następnie wkrapla się mieszając w temperaturze 2°C 26,4 g (86 mmola) karbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ w 50 ml absolutnego benzenu i pozostawia się na 15 godzin w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu w próżni pozostaje 38,8 g Nδ—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ w postaci bezbarwnego oleju, który nie krystalizuje.

Otrzymany olej rozpuszcza się w 200 ml metanolu i dodaje 8,5 ml (175 mmola) wodzianu hydrazyny. Mieszaninę pozostawia się na 20 godzin w temperaturze pokojowej i następnie odparowuje w próżni. Pozostałość przekrystalizowuje z mieszaniny wody i alkoholu. Otrzymuje się 32,2 g Na—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—NH—NH₂ o temperaturze topnienia 110–120°C; $[\alpha]_D^{25} = -7,23^\circ$ (1,03 w metanolu).

Na—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃. 31,6 g (72,3 mmola) otrzymanego hydrazidu rozpuszcza się w 200 ml 2n kwasu solnego i 200 ml octanu etylu mieszając i do roztworu dodaje się 15 ml lodowatego kwasu octowego. W temperaturze 5°C wkrapla się następnie 50% roztwór azotynu sodowego w takiej ilości aż papierek jodokrobiowy nie odbarwia się po 5 minutach (około 10 ml). Fazę wodną następnie oddziela się. Fazę organiczną przemywa się wodą z lodem i dwa razy 10% roztworem wodorowęglanu potasowego, następnie przesącza suszy siarczanem sodowym i dodaje do roztworu 20,5 g (72,3 mmola) H—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃.

Mieszaninę pozostawia się w ciągu 18 godzin w temperaturze pokojowej, po czym przemywa dwukrotnie 3n kwasem solnym, dwukrotnie wodą i jeden raz nasyconym roztworem chlorku sodowego, następnie suszy i odparowuje w próżni.

Stałą pozostałość przekrystalizowuje się z mieszaniny benzenu i eteru naftowego. Otrzymuje się 30 g (61%) Na—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ o temperaturze topnienia 83–93°C; $[\alpha]_D^{25} = -6,55^\circ$ (0,99 w metanolu).

Na—oktyloksykarbonylo—L—orn—L—orn—OCH₃ · 2HCl 27,9 g (40,8 mmola) Na—oktyloksykarbonylo—(Nδ—Z)—L—orn—(Nδ—Z)—L—orn—OCH₃ poddaje się hydrogenolizie w 200 ml lodowatego kwasu octowego z dodatkiem 5 g 10 procentowego węgla palladowego. Po pochłonięciu 2,1 litrów wodoru uwodornienie ustaje. Uwodornioną mieszaninę przesącza się i przesącza odparowuje w próżni. Pozostałość rozpuszcza się w 100 ml 2n metanolewego roztworu kwasu solnego i roztwór ponownie odparowuje w próżni. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny metanol (eter otrzymuje się 9,2 g Na—oktyloksykarbonylo—L—orn—L—orn—OCH₃ · 2HCl o temperaturze topnienia 206–211°C (rozkład); $[\alpha]_D^{25} = -16,8^\circ$ (0,99 w metanolu).

Przykład III. Na—lauryloksykarbonylo—(Nδ—Z)—D—dab—OH.

28,7 g (0,154 mola) alkoholu laurylowego rozpuszcza się w 350 ml benzenu i uwalnia od wody przez destylację azeotropową. Następnie w temperaturze 60°C wprowadza się mieszając gazowy fosgen, uzyskany przez odparowanie 21,2 ml (0,3 mola) skroplonego fosgenu, po czym mieszaninę miesza się jeszcze w ciągu 4 godzin w tej samej temperaturze. Następnie oddestylowuje się w strumieniu azotu połowę benzenu, ażeby usunąć nadmiar fosgenu i kwasu solnego, a resztę odparowuje się w próżni, aż do stałej wagi. Otrzymuje się 36,2 g chlorku lauryloksykarbonylowego w postaci oleistej pozostałości, której dalej się nie oczyszcza.

36,6 g (145 mmola) H—(Nγ—Z)—D—dab—OH rozpuszcza się w 160 ml ługu sodowego i 50 ml acetonu i mieszając wkrapla jednocześnie w temperaturze 5°C 36,2 g (145 mmola) chlorku lauryloksykarbonylowego i 145 mola 1n ługu sodowego (około 35 minut). Mieszaninę miesza się dalej w ciągu 30 minut następnie zakwasza 3n kwasem solnym i dwukrotnie ekstrahuje octanem etylu. Roztwór w octanie etylu przemywa się dwukrotnie 1n kwasem solnym i dwukrotnie wodą, po czym suszy siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Pozostałość po odparowaniu krystalizuje przy uciepaniu z małą ilością wody, po czym przekrystalizowuje się ją z heksanu. Otrzymuje się 53,5 g N—lauryloksykarbonylo—(N—Z)—D—dab—OH o temperaturze topnienia 69–72°C; $[\alpha]_D^{25} = +7,88^\circ$ (1,00 w metanolu).

Na—lauryloksykarbonylo—(Nγ—Z)—D—dab—(Nγ—Z)—D—dab—OCH₃ 23 g (76 mmola) H—(Nγ—Z)—D—dab—OCH₃ · HCl rozdrabnia się dokładnie i sporządza się zawiesinę w 50 ml chloroformu, dodaje 11,2 ml (76 mmola) trójetyloaminy, silnie wytrząsa i dodaje 200 ml eteru. Mieszaninę utrzymuje się w ciągu 20 minut w kąpieli lodowej, a następnie chlorek trójetyloaminowy odsącza się.

35 g (76 mmola) Na—lauryloksykarbonylo—(Nγ—Z)—D—dab—OH rozpuszcza się w 150 ml absolutnego czterohydrofuranu, oziębia roztwór do temperatury 5–10°C i dodaje mieszając 13 g (76

mmola) 95 procentowego karbonylodwuimidazolu. Po 30 minutach mieszania, dodaje się roztwór wyżej otrzymany i mieszaninę pozostawia w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu w próżni pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i roztwór w octanie etylu przemywa 3 razy 1n kwasem solnym i 1 raz wodą (dodając nieco metanolu dla lepszego rozdzielania faz). Następnie suszy się siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny chloroformu i eteru naftowego otrzymuje się 18.9 g N-lauryloksykarbonylo-(N_Y-Z)-d-Dab-(N_Y-Z)D-dab-OCH₃ o temperaturze topnienia 107–109°; $[\alpha]_D^{25} = +18.7$ (0.99 w metanolu).

N_α-lauryloksykarbonylo-D-dab-D-dab-OCH₃ · 2HCl 17.5 g (24.5 mmola) N_α-lauryloksykarbonylo-(N_Y-Z)-D-dab-(N_Y-Z)-D-dab-OCH₃ w 200 ml lodowatego kwasu octowego przeprowadza się do roztworu przez lekkie ogrzewanie i poddaje się hydrogenolizie w obecności 5 g 5 procentowego węgla palladowego. Po pobraniu 1.2 litra wodoru uwodornianie ustaje. Katalizator odsacza się, odparowuje przesącz w próżni, a do oleistej pozostałości dodaje się 60 ml metanolowego roztworu kwasu solnego i ponownie odparowuje. Z mieszaniny metanolu i eteru krystalizuje 8.1 g chromatograficznie czystego związku N-lauryloksykarbonylo-D-dab-D-dab-OCH₃ · 2HCl, o temperaturze topnienia 188–194°C; $[\alpha]_D^{25} = +17.4$ C = 1.00 w metanolu.

Przykład IV. N_α-formylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃.

26.3 g N_α-formylo-(N_e-Z)-L-liz-OH (J. Amer. Chem. Soc. 82, 3727 (1960) rozpuszcza się w 150 ml absolutnego czterohydrofuranu i dodaje się w temperaturze –10°C mieszając 13.8 g karbonylodwuimidazolu. Po 30 minutach dodaje się roztwór H-(N_e-Z)-L-liz-OHC₃ (uwolniony z 28 g chlorowodoru za pomocą trójetiloaminy) w 50 ml czterohydrofuranu i miesza dalej w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę odparowuje się w próżni, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i roztwór w octanie etylu przemywa kolejno lodowatym 1-molarnym roztworem kwasu winowego, wodą z lodem, 10% roztworem wodorowęglanu potasowego i nasyconym roztworem chlorku sodowego.

Następnie roztwór w octanie etylu suszy siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Otrzymany z mieszaniny acetonu i eteru N_α-formylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-CH₃ topnieje w temperaturze 147–149°C; $[\alpha]_D^{25} = -16.9$ ° (C=1.0 w metanolu).

Odforylowanie N_α-formylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃ 40 g N_α-formylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃ rozpuszcza się w 150 ml metanolu. Roztwór ochładza się do temperatury pokojowej, dodaje około 300 ml roztworu gazowego chlorowodoru w metanolu (4n) i pozostawia na 6 godzin. Następnie roztwór odparowuje się w temperaturze 40°C, pozostałość rozpuszcza w metanolu i roztwór ponownie odparowuje. Tę operację powtarza się jeszcze trzykrotnie. W końcu otrzymuje się oleisty surowy produkt, który bezpośrednio przerabia się dalej.

N_α — mirystyloksykarbonylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃ 40.5 g otrzymanego surowego produktu rozpuszcza się w 200 ml czterohydrofuranu i w celu uwolnienia zasady dodaje 22 ml trójetiloaminy. Wytrącony chlorowodorek trójetiloaminy po krótkim oziębieniu odsacza się. Do przesączu dodaje się ponownie 22 ml trójetiloaminy i ochładza do temperatury –10°C. Miesząc wkrapla się roztwór 18.7 g chlorku mirystyloksykarbonylowego w 20 ml czterohydrofuranu.

Po dalszym mieszanii w temperaturze około 0°C mieszaninę reakcyjną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i przemywa 0.1 n kwasem solnym. Wyszczony roztwór w octanie etylu odparowuje się, przy czym wytrąca się N_α-mirystyloksykarbonylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃. Po przekrystalizowaniu z octanu etylu substancja topnieje w temperaturze 110–113°C.

N_α-mirystyloksykarbonylo-L-liz-L-liz-OCH₃ 16 g otrzymanego związku N_α-mirystyloksykarbonylo-(N_e-Z)-L-liz-(N_e-Z)-L-liz-OCH₃ rozpuszcza się w 200 ml lodowatego kwasu octowego i uwodarnia się w obecności 2 g węgla palladowego, przy czym aby osiągnąć całkowite uwodornienie dodaje się jednorazowo katalizator. Następnie wydziela się octan etylu pod zmniejszonym ciśnieniem i do pozostałości w celu przeprowadzenia octanu w chlorowodorek dodaje mieszaniny kwasu solnego i metanolu. Otrzymuje się N_α-mirystyloksykarbonylo-L-liz-L-liz-OCH₃ · 2HCl, o temperaturze topnienia 171–173°C; (z mieszaniny metanolu i eteru; $[\alpha]_D^{25} = 16$ ° C = 1 w wodzie).

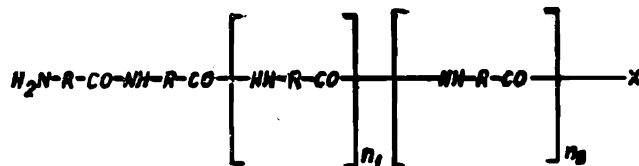
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania peptydów według patentu nr 48 665, **znamienny tym**, że peptydy o ogólnym wzorze 1, w którym n₁ i n₂ oznaczają liczbę 0 lub 1, X oznacza grupę hydroksylową, alkoksylową, aminową, jednoalkiloaminową, dwualkiloaminową lub hydrazynową, a każdy z symboli R oznacza resztę kwasu α-aminokarboksylowego uwolnioną od grupy α-aminowej i karboksylowej, przy czym co najmniej jedna reszta R zawiera grupę aminową i przynajmniej jedna grupa aminowa cząsteczki zawiera długołańcuchową resztę alkoksykarbonylową lub alkenyloksykarbonylową, wytwarza się przez reakcję związku o ogólnym wzorze 2 ze związkiem o ogólnym wzorze 3, przy czym w tych wzorach symbole a, b, c i d oznaczają liczbę 0 lub 1, a suma ich wynosi 0, 1 lub 2, Y oznacza atom chlorowca, grupę hydroksylową lub resztę N₃ kwasu azotowodorowego ewentualnie nitrowaną grupę fenoksyloową, grupę fenylomerkapto lub resztę bezwodnika z nieorganicznym lub organicznym kwasem, X' oznacza grupę alkoksylową, aminową, jednoalkiloaminową, dwualkiloaminową, lub grupę hydroksylową w postaci soli z nieorganiczną zasadą lub trzeciorzędową zasadą organiczną, a symbole R' oznaczają resztę kwasu aminokarboksylowego, uwolnioną od grupy α-aminowej i grupy karboksylowej, przy czym przynajmniej jedna reszta R zawiera grupę aminową, a wszystkie pozostałe grupy aminowe

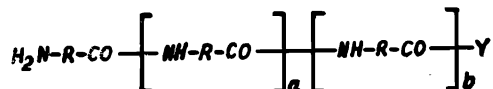
znajdujące się w związkach o wzorach 2 i 3 z wyjątkiem grupy α -aminowej znajdującej się we wzorze 3 na lewym końcu łańcucha są chronione za pomocą dających się odszczepić grup ochronnych i (lub) długołańcuchowych reszt alkoksycarbonylowych lub alkenyloksycarbonylowych, przy czym odszczepia się HY, i otrzymuje się dwu-, trój- lub czteropeptyd o ogólnym wzorze 4, w którym R, X', n_1 i n_2 mają wyżej podane znaczenie, i wszystkie znajdujące się w cząsteczce grupy aminowe są chronione w sposób wyżej podany, a w przypadku gdy otrzymane peptydy nie zawierają w żadnej grupie aminowej długołańcuchowej reszty alkoksycarbonylowej lub alkenyloksycarbonylowej, przez zmianę selektywnie odszczepialnych grup ochronnych na co najmniej jedną tego rodzaju resztę przeprowadza się w odpowiednie peptydy, podstawione długołańcuchowymi grupami alkoksycarbonylowymi, lub alkenyloksycarbonylowymi i otrzymany produkt przeprowadza się ewentualnie w hydrazyd, z uzyskanego peptydu odszczepia się zdolne do odszczepienia grupy

ochronne i wytworzone związki ewentualnie przeprowadza się w addycyjne sole z kwasami.

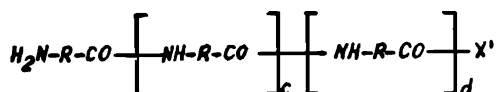
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako związki wyjściowe stosuje się związki o wzorach 2 i 3 w których wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, przy czym związki te stanowią pochodne kwasu α , ω -dwuaminokarboksylowego w szczególności lizyny.
3. Sposób według zastrz. 1—2, **znamienny tym**, że stosuje się związki mające łańcuchowe reszty alkoksycarbonylowe lub alkenyloksycarbonylowe, zawierające w łańcuchu węglowodorowym co najmniej 8 atomów węgla.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że stosuje się związki mające długołańcuchowe reszty alkoksycarbonylowe ewentualnie alkenyloksycarbonylowe zawierające w łańcuchu węglowodorowym 8—20 atomów węgla.
5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że jako substraty stosuje się substancje o wzorach 2 i 3 w których wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie utworzone z optycznie czynnych aminokwasów, zwłaszcza konfiguracji L.



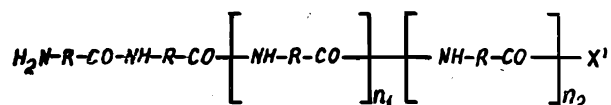
Wzór 1



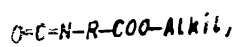
Wzór 2



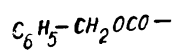
Wzór 3



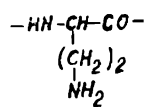
Wzór 4



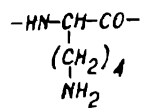
Mzór 5



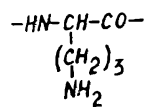
Mzór 6



Mzór 7



Mzór 8



Mzór 9