

12 w

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 93135

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 30.07.74 (P. 173145)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.08.75

Opis patentowy opublikowano: 30.10.1978

Int. Cl².

C07C 103/52

MKP

C07c 103/52

Twórcy wynalazku: Mirosław Leplawy, Zbigniew Kamiński, Urszula Grzegorzewska

Uprawniony z patentu: Politechnika Łódzka, Łódź (Polska)

Sposób syntezy oligopeptydów

Przedmiotem wynalazku jest sposób syntezy oligopeptydów, zwłaszcza dwu- i trójpeptydów o wzorze ogólnym 1, w którym n oznacza liczby od 0–3, R^1 oznacza podstawiony względnie niepodstawiony rodnik alkilowy lub aryłowy, natomiast R^2 oznacza atom wodoru albo podstawiony względnie niepodstawiony rodnik alkilowy lub aryłowy. Oligopeptydy objęte wzorem 1 posiadają w pozycji C-terminalnej reszty aminokwasów alfa, alfa-dwupodstawionych, których charakterystyczną cechą jest znaczna zawada przestrzenna. Peptydy takie są biologicznie czynne i mogą być zastosowane jako leki względnie jako półprodukty do syntezy, na przykład antybiotyków półsyntetycznych.

W znanych sposobach syntezy, do rozbudowy łańcucha peptydowego stosuje się aminokwasy, zwykle jako N- i C-blokowane pochodne. Większość tych sposobów zawodzi w przypadkach prób wbudowania w łańcuch peptydowy aminokwasów alfa, alfa-dwupodstawionych, ponieważ na skutek efektu zawady przestrzennej reakcje prowadzące do utworzenia wiązania peptydowego są tak powolne, że regeneruje się niezmienione związki wyjściowe, albo też zachodzą inne, w mniejszym stopniu hamowane przez zawadę przestrzenną reakcje. Przykładem nieskuteczności konwencjonalnego sposobu syntezy peptydów tej klasy jest opisana w czasopiśmie Journal of the Chemical Society 1962, 1440, próba syntezy aminodwufenylo-metylopenicyliny z benzyloksykarbonylo- alfa, alfa-dwufenyloglicyny i kwasu 6-aminopenicylanowego przez mieszany bezwodnik z kwasem etoksymrówkowym, w wyniku której zamiast oczekiwanego związku powstała etoksypenicylina.

Inny przykład stanowi opisana w czasopiśmie Tetrahedron, 1960, 39, próba reakcji estru cyjanometylowego benzyloksykarbonylo-alfa-metyloalaniny z estrem metylowym alfa-metyloalaniny, w której mimo długotrwałego ogrzewania zregenerowane zostały niezmienione związki wyjściowe. Zawada przestrzenna występująca przy łączeniu fragmentów alfa, alfa-dwupodstawionych aminokwasów może być przezwyciężona przez zastosowanie metody mieszanych bezwodników kwasu trójmetylooctowego, albo za pomocą sposobu o bardziej ogólnym znaczeniu, opisanego w czasopiśmie Tetrahedron 1960, 39, polegającego na użyciu oksazolónów jako aktywnych produktów przejściowych. Dla powiązania alfa-jednopodstawionych aminokwasów z alfa, alfa-dwubenzylloglicyną, a więc w przypadku, w którym efekt zawady przestrzennej jest mniejszy, zastosowany został dwucykloheksylokarbodwuimid oraz metoda „kondensacji czterech komponentów” opisana w czasopiśmie Journal of the Chemical Society, Perkin I, 1972, 2634; 1973, 98.

Według wynalazku, oligopeptydy o wzorze 1, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie posiadające w pozycji C-terminalnej resztę aminokwasu alfa, alfa-dwupodstawionego otrzymuje się z substratów nieaminokwasowych. Sposób według wynalazku polega na tym, że N-blokowany aminonitryl o wzorze ogólnym 2, w którym n i R^2 mają wyżej podane znaczenie, natomiast X oznacza grupę blokującą, zwłaszcza banzyloksykarbonylową lub tozylową, poddaje się wobec kwasu siarkowego lub fosforowego reakcji z alfa-hydroksykwasm o wzorze ogólnym 3 lub jego estrem, w którym R^1 ma wyżej podane znaczenie. W wyniku reakcji powstaje wywodzący się z peptydu oksazolony o wzorze ogólnym 4, w którym wszystkie symbole n , X oraz R^1 i R^2 mają wyżej podane znaczenie. Otrzymany oksazolony poddaje się hydrolizie prowadzącej do N-blokowanego peptydu.

W niektórych przypadkach bezpośrednim produktem reakcji N-blokowanego aminonitrylu z alfa-hydroksykwasm jest N-blokowany peptyd. Z punktu widzenia mechanicystycznego reakcja N-blokowanego aminonitrylu z hydroksykwasm jest zbliżona do katalizowanej kwasami hydratacji nitryli, przy czym jest ona inicjowana przez atak jonu karboniowego, tworzącego się w rezultacie oderwania od hydroksykwasu anionu wodorotlenowego, na słabo zasadowy atom azotu grupy nitrylowej, w wyniku czego tworzy się sól nitrylowa, która z kolei pod wpływem wody łatwo przechodzi w peptyd. W warunkach reakcji, utworzony peptyd ulega pod wpływem kwasu siarkowego lub fosforowego dehydratacji do odpowiedniego oksazolonu. I tak na przykład w reakcji tozylaminoizobutyronitrylu z kwasem benzylovym w obecności kwasu siarkowego, powstaje 4,4-dwufenylo-2-/1'-metylo-1'-tolueno-p-sulfonamido/-etylooksazolony z wydajnością 81%. Powyższy związek wywodzi się z powstającej wcześniej tozyl-alfa-metyloalanylo-alfa, alfa-dwufenyloglicyny, a jego utworzenie jest wynikiem dehydratacji wspomnianego dwupeptydu. Utworzenie się w opisanej reakcji oksazolonu a nie dwupeptydu jest korzystne z uwagi na możliwość wykorzystania tego związku do bezpośredniego przedłużenia łańcucha dwupeptydowego.

W celu otrzymania dwupeptydu, oksazolony poddaje się hydrolizie, korzystnie w środowisku alkalicznym, a następnie usuwa się grupę blokującą X . W niektórych przypadkach synteza prowadzi do mieszaniny N-blokowanego peptydu i wywodzącego się z niego oksazolonu. I tak na przykład w reakcji tozylaminoacetonitrylu z kwasem benzylovym, obok 4,4-dwufenylo-2-/tolueno-p-sulfonamido/metylooksazolonu wyodrębnia się tozyl-alfa-alfa-dwufenyloglicynę. Fakt ten nie stanowi utrudnienia ponieważ zawarty w mieszaninie oksazolony można bez wyodrębnienia, łatwo zhydrolizować do dwupeptydu.

Sposób według wynalazku stosuje się także do syntezy trój- cztero- i pięciopeptydów. W tym przypadku, jako związku wyjściowego, używa się aminonitrylu wywodzącego się odpowiednio z dwu-, trój- i czteropeptydu. Przykładowo, reakcja benzylooksykarbonylo- alfa, alfa-dwufenyloglicyloamino dwufenyloacetonitrylu z kwasem benzylovym w obecności kwasu siarkowego, a następnie hydroliza utworzonego oksazolonu prowadzi do otrzymania benzylooksykarbonylo- alfa, alfa-dwufenyloglicylo-alfa, alfa-dwufenyloglicylo-alfa, alfa-dwufenyloglicyny. Po usunięciu grupy blokującej otrzymuje się wolny trópeptyd.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że do syntezy peptydów stosuje się związki prostsze niż aminokwasy.

Przykład I. Do oziębionej do 5°C i energicznie wstrząsanej mieszaniny tozylaminoizobutyronitrylu w ilości 2,38 g, czyli 10 milimoli i 2,28 g czyli 10 milimoli kwasu benzylovego w 40 ml eteru dwuetylowego dodano powoli 30 ml stężonego kwasu siarkowego. Wstrząsanie kontynuowano przez 2 godziny, a następnie mieszaninę reagującą pozostawiono na dalsze 2 godziny w temperaturze pokojowej, po czym wylano do naczynia z wodą i lodem. Wytrącony produkt stały odsączono, przemyto wodą, a następnie roztworem kwaśnego węglanu sodowego oraz wysuszono. Produkt krystalizowano następnie z toluenu. Otrzymano 3,65 g 4,4-dwufenylo-2-/1'-metylo-1'-tolueno-p-sulfonamido/etylooksazolonu o temperaturze topnienia $168-170^{\circ}\text{C}$ z wydajnością 81% wydajności teoretycznej. 0,89 g uprzednio otrzymanego oksazolonu wstrząsano w 2 N ługu sodowym aż do całkowitego rozpuszczenia się oksazolonu, a następnie zakwaszono za pomocą kwasu solnego. Wytrącony produkt stały krystalizowano z metanolu, zawierającego niewielką ilość wody. Otrzymano 0,89 g tozyl-alfa-metyloalanylo-alfa, alfa-dwufenyloglicyny o temperaturze topnienia $216,5-218^{\circ}\text{C}$, z wydajnością 98% wydajności teoretycznej.

0,466 g powyższego tozylodwupeptydu, co stanowi 1 milimol, rozpuszczono w 15 ml ciekłego amoniaku i intensywnie mieszając dodawano skrawki sodu, aż do chwili kiedy mieszanina przybrała ciemnoniebieską barwę utrzymującą się przez 5 minut. Dla usunięcia zabarwienia dodano niewielką ilość octanu amonowego. Zawartość kolby pozostawiono w temperaturze pokojowej w celu powolnego odparowania amoniaku. Nielotną pozostałość rozpuszczono w wodzie i przepuszczono przez kolumnę wypełnioną żywicą jonowymienną Amberlit IRC-50 w formie soli amonowej. Eluat zateżono, a suchą pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny woda/etanol. Otrzymano 0,215 g krystalicznej α -metyloalanylo- α , α -dwufenyloglicyny, co stanowi 69% wydajności teoretycznej.

Analiza elementarna do wzoru $C_{18}H_{20}N_2O_3$:

obliczono 9,0% N,

otrzymano 8,7% N.

Przykład II. Do oziębionej do 5°C i energicznie wstrząsanej mieszaniny 6,3 g, czyli 30 milimoli tozyloaminoacetonitrylu i 6,84 g, czyli 30 milimoli kwasu benzyłowego w 100 ml eteru etylowego dodano powoli 100 ml stężonego kwasu siarkowego. Wstrząsanie kontynuowano przez 2 godziny, a następnie pozostawiono mieszaninę na dalsze 2 godziny w temperaturze pokojowej, po czym wylano do naczynia z pokruszonym lodem. Wytrącony produkt stały odsączono, przemyto wodą, a następnie roztworem kwaśnego węglanu sodu. Odsączony osad krystalizowano po wysuszeniu z acetonu. W wyniku krystalizacji otrzymano 8,4 g 4,4-dwufenylo-2-/tolueno-p- sulfonamido/metylooksazonu o temperaturze topnienia $126\text{--}128^{\circ}\text{C}$ z wydajnością 67% wydajności teoretycznej. Otrzymany oksazon hydrolizowano jak w przykładzie I i otrzymano 7,1 g tozyloglicyłodwufenyloglicyny, co stanowi 81% wydajności teoretycznej. Następnie otrzymane ługi z przemycia kwaśnym węglanem sodowym zakwaszono, po czym wytrącony osad odsączono, wysuszono i przemyto eterem. Otrzymano dodatkowo 4,03 g tozyloglicyłodwufenyloglicyny o temperaturze topnienia $196\text{--}198^{\circ}\text{C}$ z wydajnością 28% wydajności teoretycznej. Glicylo- α,α -dwufenyloglicynę otrzymano w sposób analogiczny jak w przykładzie I. Wydajność wynosiła 64% wydajności teoretycznej.

Analiza elementarna dla wzoru $C_{16}H_{16}N_2O_3$:

obliczono 9,9% N,

otrzymano 9,8% N.

Przykład III. Do roztworu 1,1 g, czyli 2 milimoli nitrylu kwasu (N-benzylooksykarbonyloamino-1,1-dwufenyloacetamino)- dwufenylooctowego i 0,456 g, czyli 2 milimole kwasu benzyłowego w 10 ml eteru wkrpiono 15 ml stężonego kwasu siarkowego, przy jednoczesnym mieszaniu i chłodzeniu do 0°C . Roztwór mieszano po zakończeniu wkraplania przez 2 godziny w temperaturze 5°C i 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po wylaniu mieszaniny reakcyjnej na pokruszony lód, wyekstrahowano obojętny produkt za pomocą octanu etylu. Warstwę octanową po przemyciu i wysuszeniu nad bezwodnym siarczanem magnezowym odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizowano z benzenu. Otrzymano 0,92 g oksazonu, wywodzącego się z trójppeptydu N-benzylooksykarbonylo dwufenyloglicyłodwufenyloglicylo dwufenyloglicyny o wzorze ogólnym 4, w którym R oznacza fenyl, a X grupę benzylooksykarbonyłową, o temperaturze topnienia $166\text{--}168^{\circ}\text{C}$ z wydajnością 60,6 % wydajności teoretycznej. Otrzymany powyżej oksazon hydrolizowano jak w przykładzie I do N-benzylooksy karbonyłodwufenyloglicylo dwufenyloglicyłodwufenyloglicyny o temperaturze topnienia $216\text{--}220^{\circ}\text{C}$ otrzymując 0,65 g, co stanowiło 69,5% wydajności teoretycznej.

0,389 g N-benzylooksykarbonylo- α,α -dwufenyloglicylo- α,α -dwufenyloglicylo- α,α -dwufenyloglicyny, co stanowi 0,5 milimoli rozpuszczono w 25 ml 50% etanolu i dodano 0,1 g palladu na węglu aktywnym. Przez zawieszinę przepuszczono strumień wodoru, aż do zaprzestania wydzielania się dwutlenku węgla. Roztwór przesączono, osad przemyto wielokrotnie nasyconym roztworem butanolu w wodzie. Połączone przesącze odparowano do sucha. Osad przekrystalizowano z układu woda/etanol. Otrzymano 0,305 g krystalicznej α,α -dwufenyloglicylo- α,α -dwufenyloglicylo- α,α -dwufenyloglicyny, co stanowi 94,5% wydajności teoretycznej.

Analiza elementarna dla wzoru $C_{42}H_{35}N_3O_4$:

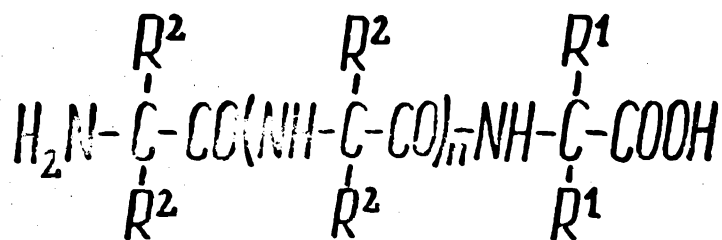
obliczono 9,9% N,

otrzymano 9,8% N.

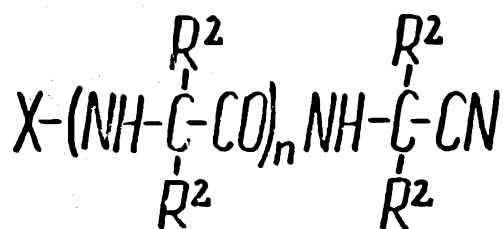
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób syntezy oligopeptydów, zwłaszcza dwu- i trójppeptydów o wzorze ogólnym 1, w którym n oznacza liczby od 0 – 3, R^1 oznacza podstawiony względnie niepodstawiony rodnik alkilowy albo aryłowy, natomiast R^2 oznacza atom wodoru albo podstawiony względnie niepodstawiony rodnik alkilowy lub aryłowy, z n a m i e n n y t y m, że N-blokowany aminonitryl o wzorze ogólnym 2, w którym n i R^2 mają wyżej podane znaczenie, natomiast X oznacza grupę blokującą, korzystnie tozyłową lub benzylooksykarbonyłową poddaje się reakcji z alfa-hydroksykwasem o wzorze ogólnym 3 lub jego estrem, w którym R^1 ma wyżej podane znaczenie, w obecności mocnego kwasu, korzystnie kwasu siarkowego lub fosforowego, po czym utworzony oksazon o wzorze ogólnym 4, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie hydrolizuje się w znany sposób do N-blokowego oligopeptydu, a następnie w znany sposób usuwa się z niego grupę blokującą.

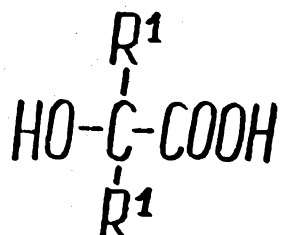
2. Sposób, według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w eterze dwuetylowym.



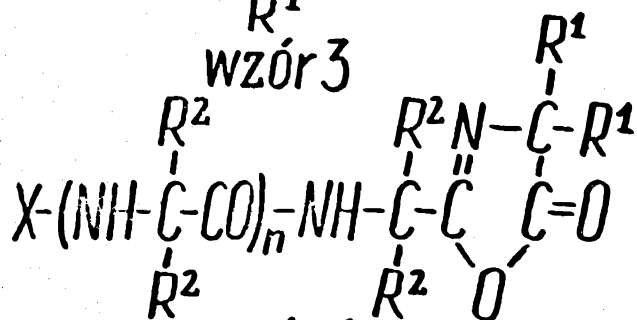
wzór 1



wzór 2



wzór 3



wzór 4