



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 648 289 A5

⑤① Int. Cl. 4: C 07 C 103/44

// A 61 K 31/16

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

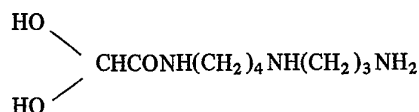
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	2918/82	㉚ Inhaber:	Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai, Shinagawa-ku/Tokyo (JP)
㉒ Anmeldungsdatum:	11.05.1982		
㉓ Priorität(en):	11.05.1981 JP 56-69340 18.05.1981 JP 56-73510	㉛ Erfinder:	Umezawa, Hamao, Nerima-ku/Tokyo (JP) Takeuchi, Tomio, Shinagawa-ku/Tokyo (JP) Kondo, Shinichi, Midori-ku/Yokohama (JP) Iinuma, Hironobu, Kita-ku/Tokyo (JP) Ikeda, Daishiro, Shibuya-ku/Tokyo (JP) Nakamura, Teruya, Kusatsu-shi (JP) Fujii, Akio, Kamakura-shi (JP)
㉔ Patent erteilt:	15.03.1985		
㉜ Patentschrift veröffentlicht:	15.03.1985	㉞ Vertreter:	Ammann Patentanwälte AG Bern, Bern

⑤④ **N-(4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl)-2,2-dihydroxyäthanamid und Verfahren zu seiner Synthese.**

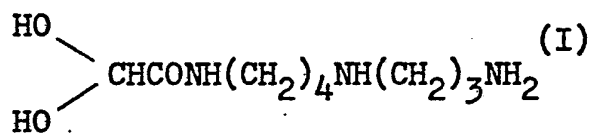
- ⑤⑦ Das neue N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid der Formel



ist nicht nur als Zwischenprodukt für die Synthese einer neuen carcinostatischen Substanz N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2-[(S)-7-guanidino-3-hydroxyheptanamido]-2-hydroxyäthanamid oder eines ihrer Derivate, sondern ebenfalls als Immunostimulans selbst nützlich.

PATENTANSPRÜCHE

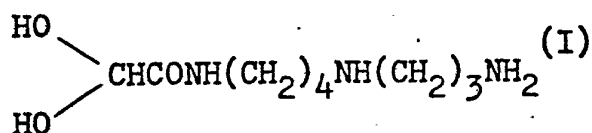
1. N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid der Formel (I)



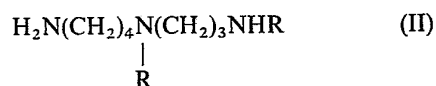
und seine Säureadditionssalze.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Säureadditionssalz das Hydrochlorid ist.

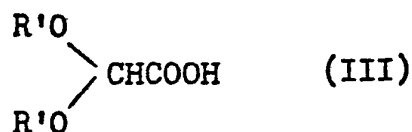
3. Verfahren zur Herstellung von N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid der Formel (I)



dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel (II)



worin R eine Amino-Schutzgruppe bedeutet, mit einem Di-alkylacetal der Glyoxylsäure der Formel (III)

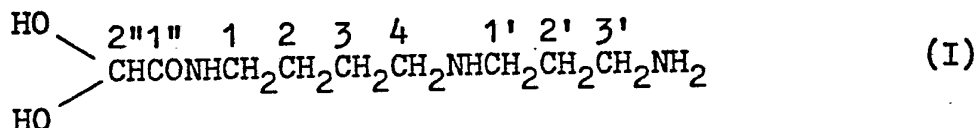


worin R' eine Alkylgruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen bedeutet, in Anwesenheit eines Aktivierungsmittels oder mit einem reaktiven Derivat der Carboxylgruppe des Acetals umgesetzt und anschliessend die Amino-Schutzgruppe und R' entfernt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Aktivierungsmittel ein ein Acylhalogenid bildendes Reagens, ein ein Säureazid bildendes Reagens, ein ein reaktiven Ester bildendes Reagens oder ein ein Säureanhydrid bildendes Reagens verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion in einem organischen Lösungsmittel bei 0 bis 100 °C während 5 bis 30 h durchgeführt wird.

Die Erfindung betrifft N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid der Formel (I)



und seine Säureadditionssalze sowie ein Verfahren zu seiner Synthese.

Die neue Verbindung ist nicht nur nützlich als Zwischenprodukt für die Synthese der neuen carcinostatischen Verbindung N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2-[(S)-7-guandino-3-hydroxyheptanamido]-2-hydroxyäthanamid oder eines seiner Derivate, sondern ebenfalls als Immunostimulans selbst nützlich.

Im Hinblick auf ihre Stabilität wird die neue erfindungsgemässe Verbindung bevorzugt in Form des Säureadditionssalzes hergestellt. Die Säuren, die zugegeben werden, sind anorganische Säuren, wie Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Borsäure, sowie organische Säuren, wie Essigsäure, Citronensäure, Weinsäure und Glutarsäure. Von diesen Säuren sind besonders die Chlorwasserstoffsäure, die Schwefelsäure und die Weinsäure bevorzugt.

Die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften der erfindungsgemässen Verbindungen sind wie folgt.

(1) Physikalisch-chemische Eigenschaften

Das Hydrochlorid der erfindungsgemässen Verbindung ist ein weisses Pulver, das keinen ausgeprägten Schmelzpunkt aufweist. Die Elementaranalyse stimmt mit der theoretisch auf $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl}$ berechneten (C 36,99%, H 7,93%, N 14,38%, Cl 24,27%) überein. Das Protonen-NMR, bestimmt in schwerem Wasser, zeigt charakteristische Signale bei $\delta = 2,1$ (2-, 3- CH_2), 2,4-2,7 (2'- CH_2), 3,5-3,8 (1-, 4-, 1'-, 3'- CH_2), 5,77 (2''-CH, S).

(2) Biologische Eigenschaften

Die Wirkung der erfindungsgemässen Verbindung (Hydrochlorid) auf die verzögerte Hypersensibilität gegenüber roten Blutkörperchen von Schafen ist in Tabelle 1 angegeben. Der Versuch wird gemäss dem Verfahren von Macka-

ness et al. [P. H. Lagrange, G. B. Mackaness und T. E. Miller, J. Exp. Med., 139, 528-542 (1974)] folgendermassen durchgeführt.

6 Wochen alte weibliche CDF₁-Mäuse werden durch intravenöse Injektion von jeweils 10^5 roten Blutzellen von Schafen immunisiert, und gleichzeitig werden unterschiedliche Mengen an Verbindung der Formel (I) (Hydrochlorid) peritoneal injiziert. Nach 4 Tagen werden jeder Maus 10^8 rote Blutkörperchen von Schafen subkutan zur Induzierung der Reaktion injiziert. Nach 24 h wird das Anschwellen des Fusskissens (footpad) jeder Maus mittels eines gleitenden Dickenmessers bestimmt.

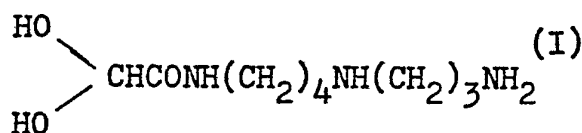
Tabelle 1

Immunisierung (SRBC)	Verbindung der Formel (I), (µg/Maus i.p.)	Zunahme der Fusskissendicke (× 0,1 mm ± S.D)	T/C (%)
55 10^5	keine	$8,0 \pm 0,7$	100
10^5	1	$13,0 \pm 1,7$	163
10^5	4	$13,0 \pm 0,5$	163
10^5	16	$13,4 \pm 0,6$	168
10^5	63	$14,9 \pm 0,9$	186
60 10^5	250	$11,8 \pm 0,6$	148
10^5	1000	$11,7 \pm 1,0$	146

SRBC = rote Blutkörperchen von Schafen

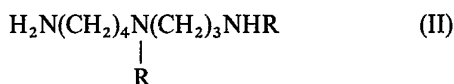
Aus Tabelle 1 folgt, dass die Reaktion durch Verabreichung von 1 µg bis 1 mg an Verbindung der Formel (I) verstärkt wurde.

Die erfindungsgemässe Verbindung N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid der Formel (I)

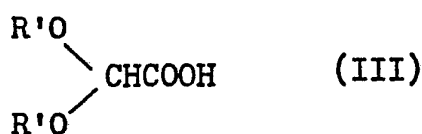


wird auf folgende Weise synthetisiert.

Eine Verbindung der Formel (II)



worin R eine Amino-Schutzgruppe, wie eine Benzyloxycarbonyl-, Chloracetyl- oder Niedrigalkyloxycarbonyl-Gruppe bedeutet, wird mit einem Dialkylacetal von Glyoxylsäure der folgenden Formel (III)



worin R' eine Alkylgruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen bedeutet, oder einem reaktiven Derivat der Carboxylgruppe des Dialkylacetals kondensiert und anschliessend wird die Amino-Schutzgruppe und die Gruppe R' entfernt, wobei man die Verbindung der Formel (I) erhält.

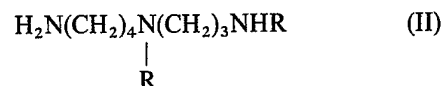
Die Kondensation der Verbindung der Formel (II) mit der Verbindung der Formel (III) oder ihrem reaktiven Derivat erfolgt gemäss dem Verfahren für die Bildung einer üblichen Amidbindung in der Peptidsynthese, wobei man beispielsweise ein Acylhalogenid, ein Säureazid, einen reaktiven Ester oder ein Säureanhydrid verwendet. Die Kondensation erfolgt somit in Anwesenheit eines Aktivierungsmittels für die Carboxylgruppe der Verbindung der Formel (III). Beispiele geeigneter Reagentien, die für die Aktivierung der Carboxylgruppe oder die Bildung eines reaktiven Derivats verwendet werden, umfassen Reagentien für die Bildung aktiver Ester, wie 6-Chlor-1-p-chlorbenzolsulfonyloxybenzotriazol (CCBT), N-Äthyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat (NEPIS), N-tert.-Butyl-5-methylisoxazoliumperchlorat, N-Äthoxycarbonyl-2-äthoxy-1,2-dihydrochinolin, Di-p-nitrophenylsulfid, Tri-p-nitrophenylphosphit, p-Nitrophenyltrichloracetat, N-Hydroxysuccinimid, p-Nitrophenyl, Pentachlorphenol und Benzylalkohol; Carbodiimide, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid, Di-p-toluylocarbodiimid und Diisopropylcarbodiimid; sowie Reagentien für die Azidsynthese.

Die Kondensationsreaktion erfolgt bevorzugt in einem organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, und bei einer Temperatur von im allgemeinen 0 bis 100 °C, bevorzugt 10 bis 40 °C. Obwohl die Reaktionszeit mit der Reaktionstemperatur variiert, beträgt sie etwa 5 bis etwa 30 h bei Raumtemperatur. Die Menge an Carbonsäure der Formel (III) oder einem reaktiven Derivat derselben, die verwendet wird, beträgt 0,5 bis 10 Mol und bevorzugt 2 bis 5 Mol/Mol Amin der Formel (II).

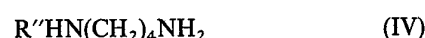
Die Entfernung der Schutzgruppen aus dem oben beschriebenen Kondensat kann durch Hydrolyse oder durch Reduktion entsprechend der Art der Schutzgruppe erfolgen. Schutzgruppen, die durch saure Hydrolyse entfernt werden können, sind bevorzugt. Wenn beispielsweise die Amino-Schutzgruppe eine tert.-Butoxy-carbonyl-Gruppe und die

Aldehyd-Schutzgruppe ein Diäthylacetal ist, erfolgt die Hydrolyse in wässriger Dioxanlösung durch Zugabe von 2 bis 3 Äquiv. verdünnter Chlorwasserstoffsäure und 2- bis 5stündiges Erhitzen bei 100 °C, wobei man das Hydrochlorid der erfindungsgemässen Verbindung der Formel (I) erhält. Wenn die Amino-Schutzgruppe eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe ist, erfolgt die Entfernung der Schutzgruppe bevorzugt durch Hydrogenolyse unter Verwendung von Palladium, Platinoxid oder einer ähnlichen Verbindung.

Die Ausgangsverbindung der Formel (II)



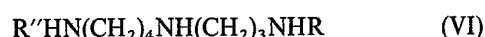
worin R eine Amino-Schutzgruppe bedeutet, ist schwierig in guter Ausbeute durch selektive Einführung von zwei Amino-Schutzgruppen in Spermidin herzustellen. Daher wird es durch Kondensation in an sich bekannter Weise eines Monoamino-geschützten 1,4-Butandiamins der Formel (IV)



worin R'' eine Amino-Schutzgruppe bedeutet, die sich von der obigen Gruppe R unterscheidet, mit einem Amino-geschützten 3-Halogenpropanamid der Formel (V)



worin R die gleiche Amino-Schutzgruppe, wie oben angegeben, bedeutet und X für ein Halogenatom steht, unter Bildung einer Verbindung der Formel (VI)



worin R und R'' Amino-Schutzgruppen bedeuten, die sich voneinander unterscheiden, und nachfolgendes Schützen der verbleibenden Iminogruppe mit der gleichen Amino-Schutzgruppe wie R und selektives Entfernen der anderen Amino-Schutzgruppe R'' unter Bildung der Verbindung der Formel (II) hergestellt.

Alternativ kann die Verbindung der Formel (VI) durch Kondensation eines Monoamino-geschützten 1,3-Propan-diamins der Formel (VII)



worin R die oben gegebene Bedeutung besitzt, mit einem Amino-geschützten 4-Halogenbutanamin der Formel (VIII)



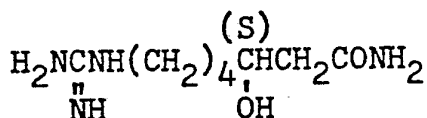
worin R'' und X die oben angegebene Bedeutung besitzen, auf die vorstehend beschriebene Weise hergestellt werden.

Für den Schutz der Aminogruppen werden solche Amino-Schutzgruppen, wie sie üblicherweise in der Peptidsynthese eingesetzt werden, verwendet. Die Amino-Schutzgruppe von R'' sollte jedoch selektiv entfernbar sein, wobei die Amino-Schutzgruppe R zurückbleibt. Dementsprechend ist eine Kombination einer Benzyloxycarbonylgruppe, durch die Hydrogenolyse entfernbar ist, und einer tert.-Butoxycarbonylgruppe, die durch Behandlung mit einer schwachen Säure entfernbar ist, besonders bevorzugt. Irgendeines von diesem Paar kann R oder R'' sein.

Die Kondensation einer Verbindung der Formel (IV) mit einer Verbindung der Formel (V) oder die Kondensation einer Verbindung der Formel (VII) mit einer Verbindung der Formel (VIII) wird leicht in einem wasserfreien Lösungsmit-

tel, wie N,N-Dimethylformamid, bei Zimmertemperatur in Gegenwart von Triäthylamin durchgeführt. Das Halogen in der Verbindung der Formel (VIII) ist bevorzugt Brom. Das Dialkylacetal der Glyoxylsäure der Formel (III) wird leicht durch Umsetzung von Glyoxylsäure mit einem Alkanol unter Verwendung eines sauren Katalysators in an sich bekannter Weise hergestellt. Geeignete Alkanole für die Verwendung sind Methanol, Äthanol, Propanol, butanol und Amylalkohol. Das Dialkylacetal der Formel (III) wird zweckdienlich durch alkalische Hydrolyse von im Handel erhältlichen Äthyl-2,2-diäthoxyacetat erhalten.

Ausgehend von der erfindungsgemässen Verbindung der Formel (I) wird eine nützliche carcinostatische Substanz, N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2-[(S)-7-guanidino-3-hydroxyheptanamido]-2-hydroxyäthanamid (kurz GHA-GS) durch Kondensation der erfindungsgemässen Verbindung der Formel (I) mit (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid der Formel



durch Erhitzen beider Verbindungen in Gegenwart einer anorganischen oder organischen Säure hergestellt. Wie im folgenden angegeben, zeigt GHA-GS eine carcinostatische Aktivität gegenüber Mäuse-Leukämie L1210 und ist nützlich als Antitumormittel.

Die carcinostatische Wirkung von GHA-GS bei Mäuse Leukämie L1210:

Eine Gruppe von fünf männlichen Mäusen des BDF₁-Stamms (6 Wochen alt) wird intraperitoneal mit 10⁵ L1210-Zellen inokuliert und unmittelbar darauf wird jeder Maus intraperitoneal eine physiologische Salzlösung der Probe einmal täglich während 6 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht, um die Verlängerungsrate der Überlebenszeit [(T/C) × 100; T/C = (mittlere Überlebenszeit der behandelten Gruppe)/(mittlere Überlebenszeit der unbehandelten Gruppe)] zu bestimmen.

Probe	Dosis (mg/kg/Tag)	Verlängerungsrate d. Überlebenszeit (T/C) × 100 (%)	Zahl der nach 30 Tagen leben- den Mäuse
GHA-GS	1,56	115	0
	3,13	> 254	1
	6,25	> 341	3
	12,5	> 405	4
	25	> 351	2
	50	> 365	2

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel

(a) Synthese von Mono-N-benzyloxycarbonyl-1,4-butandiamin

In 30 ml 50%igem wässrigem Methanol löst man 1,76 g (20 mmol) 1,4-Butandiamin und gibt anschliessend 5,48 g (20 mmol) S-Benzoyloxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidin (Produkt der Kokusan Kagaku Co.) zu. Die Mischung wird 3 h gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch zur Entfernung des Niederschlags filtriert [2,08 g (29%) Di-N-benzyloxycarbonyl-Verbindung werden gewonnen] und das Filtrat wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 250 ml Chloroform gelöst, 5 Mal mit 100 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformschicht wird über wasserfreiem

Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingedampft. Man erhält 1,0 g (23% Ausbeute) Mono-N-benzyloxycarbonyl-1,4-butandiamin in Form eines farblosen Sirups.

(b) Synthese von O-Tosyl-3-tert.-butoxycarbonyl-amino-1-propanol

In 30 ml Methanol löst man 1,5 g (20 mmol) 3-Amino-1-propanol und gibt anschliessend 4,8 g (20 mmol) S-tert.-Butoxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidin (ein Produkt der Kokusan Kagaku Co.) zu. Das Gemisch wird 6 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft, in 200 ml Chloroform gelöst und mit 200 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformschicht wird konzentriert und der Säulenchromatographie unter Verwendung von 300 g Silikagel (Wako-Gel[®] C-200) und eines Gemisches von Toluol und Äthylacetat (1:1, ausgedrückt durch das Volumen) als Entwicklungslösungsmittel unterworfen. Die Fraktionen 82 bis 151 (jeweils 15 ml Volumen) werden vereinigt, zur Trockene eingedampft und man erhält 2,95 g (84% Ausbeute) tert.-Butoxycarbonylamino-1-propanol in Form eines farblosen Öls.

In 50 ml Pyridin löst man 2,95 g (16,9 mmol) 3-tert.-Butoxycarbonylamino-1-propanol. Zu der Lösung gibt man unter Kühlen mit Eis und unter einer Argonatmosphäre tropfenweise im Verlauf von 40 min eine Lösung von 3,36 g (17,7 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid in Pyridin. Das Gemisch wird über Nacht bei 7 °C stehengelassen, dann mit einem geringen Volumen Wasser versetzt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml Chloroform gelöst, nacheinander mit 5%iger wässriger Kaliumhydrogensulfatlösung, gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, zur Trockene eingedampft und der Säulenchromatographie unter Verwendung von 120 g Silikagel (Wako-Gel[®] C-200) und eines Gemisches von Toluol und Äthylacetat (8:1, ausgedrückt durch das Volumen) als Entwicklungslösungsmittel unterworfen. Die Fraktionen Nr. 35 bis 68 (jeweils 15 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 3,06 g (55% Ausbeute) O-Tosyl-3-tert.-butoxycarbonyl-amino-1-propanol in Form eines farblosen Öls.

(c) Synthese von N-tert.-Butoxycarbonyl-N'-(tert.-butoxycarbonylamino-1,4-butandiamin

In 15 ml Dimethylformamid löst man 800 mg (2,43 mmol) des oben unter (b) erhaltenen O-Tosyl-3-tert.-butoxycarbonylamino-1-propanols. Nach Zugabe von 510 mg (4,8 mmol) Lithiumbromid (LiBr · H₂O) wird die Mischung 24 h bei Zimmertemperatur gerührt. Man versetzt die das Bromderivat enthaltende Mischung mit 540 mg (2,43 mmol) des unter (a) erhaltenen Mono-N-benzyloxycarbonyl-1,4-butandiamins und mit 0,34 ml Triäthylamin. Die Mischung wird 48 h bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 699 mg (2,9 mmol) S-tert.-Butoxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidin vermischt und 13 h bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird zur Trockene eingedampft, in 100 ml Chloroform gelöst, mit 50 ml Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in einem geringen Volumen eines Gemisches aus Toluol und Äthylacetat (4:1, ausgedrückt durch das Volumen) gelöst und der Säulenchromatographie unter Verwendung von 200 g Silikagel (Wako-Gel[®] C-200) und eines Gemisches von Toluol und Äthylacetat (4:1, ausgedrückt durch das Volumen) als Entwicklungslösungsmittel unterworfen. Die Fraktionen Nr. 134 bis 165 (jeweils 12 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 608 mg (52% Ausbeute) N-Benzoyloxycarbonyl-

N-tert.-butoxycarbonyl-N'-(tert.-butoxycarbonylaminopropyl)-1,4-butandiamin in Form eines farblosen Sirups.

In 5 ml Methanol löst man 144 mg (0,3 mmol) der obigen Verbindung in Form eines farblosen Sirups. Nach Zugabe von 100 mg 5%igem Palladium-Bariumcarbonat wird das Gemisch 5 h unter einem Wasserstoffstrom bei Zimmertemperatur gerührt, durch Filtration vom Katalysator befreit und zur Trockene eingedampft. Man erhält 103 mg (100% Ausbeute) N-tert.-Butoxycarbonyl-N'-(tert.-butoxycarbonylaminopropyl)-1,4-butandiamin.

(d) Synthese von N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxybutanamid

In 2 ml Äthylacetat löst man 100 mg (0,29 mmol) N-tert.-Butoxycarbonyl-N'-(tert.-butoxycarbonylaminopropyl)-1,4-butandiamin, erhalten unter (c) oben, und 148 mg (1 mmol) 2,2-Diäthoxyessigsäure. Nach Zugabe von 135 mg (1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid wird die Mischung 15 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird zur Entfernung des Niederschlags filtriert und der Niederschlag wird mit kaltem Äthylacetat gewaschen. Das Filtrat und die Waschflüssigkeiten werden vereinigt und nacheinander mit 1 M wässrigem Ammoniak und Wasser gewaschen. Die Äthylacetatschicht wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird der Säulenchromatographie unter Verwendung von 20 g Silikagel (Wako-Gel® C-200) und eines Gemisches von Toluol und Äthylacetat (1:2, ausgedrückt durch das Volumen) als Entwicklungslösungsmittel unterworfen. Die Fraktionen Nr. 14 bis 21 (jeweils 3 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 109 mg (79% Ausbeute) N-[4-(3-tert.-Butoxycarbonylaminopropyl)-4-tert.-butoxycarbonylaminobutyl]-2,2-diäthoxyäthanamid in Form eines farblosen Sirups.

In 1 ml Dioxan löst man 44 mg (0,13 mmol) der obigen sirupartigen Substanz. Nach Zugabe von 2,5 ml 0,1n Chlorwasserstoffsäure wird das Gemisch 4 h in einem auf 100 °C erhitzten Ölbad gerührt. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe von 0,2n wässriger Natriumhydroxidlösung auf pH 6 eingestellt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 1,5 ml Methanol extrahiert. Der Extrakt wird durch eine mit 100 ml Sephadex® LH-20 gepackte Säule (16,5 mm Innendurchmesser) geleitet und mit Methanol entwickelt. Die Fraktionen Nr. 22 bis 25 (jeweils 2 ml Volumen), die gegenüber dem Ninhydrin-Test positiv sind, werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 13 mg (46% Ausbeute) N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid-dihydrochlorid in Form eines farblosen Sirups.

Bezugsbeispiel

Synthese von GHA-GS

Ein Gemisch von 51 mg (0,214 mmol) (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid-hydrochlorid, 112 mg (0,385 mmol) N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroxyäthanamid-dihydrochlorid, 70 mg (0,53 mmol) Glutarsäure und 0,07 ml (3,9 mmol) Wasser wird 43 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 20 ml 0,4 M Natriumchloridlösung versetzt, mit 10%igem wässrigem Ammoniak auf pH 6,1 eingestellt und durch eine Säule (12 mm Innendurchmesser) geleitet, die mit 20 ml CM Sephadex® C-25, äquilibriert mit 0,4 M Natriumchloridlösung, gepackt war. Die Säule wird dann der Gradientenelution unter Verwendung von jeweils 80 ml einer 0,4 M und einer 1,0 M Natriumchloridlösung unterworfen. Die Fraktionen Nr. 41 bis 50 (jeweils 2 ml Volumen) werden vereinigt, zur Trockene eingedampft und dreimal mit 10 ml Methanol extrahiert. Der Methanolex-

trakt wird durch eine mit 100 ml Sephadex® LH-20 bepakte Säule (20 mm Innendurchmesser) geleitet und mit Methanol entwickelt. Die Fraktionen Nr. 30 bis 42 (jeweils 1 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 38,4 mg (35% Ausbeute) eines weissen Pulvers von N-[4-(3-Aminopropyl)-aminobutyl]-2-[(S)-7-guanidino-3-hydroxyheptanamido]-2-hydroxyäthanamid (GHA-GS)-trihydrochlorid. Das GHA-GS-trihydrochlorid, das auf diese Weise erhalten wurde, ist ein hygroskopisches Pulver mit nicht genau bestimmtem Schmelzpunkt. Es zeigt eine optische Drehung von $[\alpha]^{22}_D = -1^\circ \pm 2^\circ$ (C 2, Wasser). Die Elementaranalyse stimmt mit der theoretisch für $C_{17}H_{37}N_7O_4 \cdot 3HCl$ berechneten überein (C 39,81%, H 7,86%, N 9,12%, Cl 20,73%). Das Protonen-NMR, bestimmt in schwerem Wasser, zeigt charakteristische Signale bei $\delta = 1,8-2,3$ ($CH_2 \times 5$), 2,57 ($6'-CH_2$), 2,95 ($2-CH_2$), 3,5-3,8 ($NCH_2 \times 5$), 4,55 ($3-CH$) und 5,98 ($2'-CH$).

Das in dem Bezugsbeispiel verwendete (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid wird folgendermassen synthetisiert.

Synthese von (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid

(a) Synthese von (S)-3,7-Diaminoheptansäure

In 150 ml Wasser löst man 15 g (82,15 mmol) L-Lysinhydrochlorid und setzt 8,7 g (82,15 mmol) Natriumcarbonat und 43,2 g (200 mmol) N-Äthoxycarbonylphthalimid zu. Die Mischung wird 20 h bei Zimmertemperatur gerührt und dann wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml Äthylacetat gewaschen. Die wässrige Schicht wird mit 6n Chlorwasserstoffsäure auf einen pH von 3,0 eingestellt und dreimal mit 100 ml Toluol extrahiert. Der Extrakt wird zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen, das auf pH 2,0 eingestellt worden war, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Man erhält 27,95 g (84% Ausbeute) eines weissen Pulvers von Di-N-phthaloyl-L-lysin; Zersetzungspunkt 71 bis 72 °C, $[\alpha]^{22}_D = -32^\circ$ (C 1, Methanol).

Zu 27,0 g (66,4 mmol) Di-N-phthaloyl-L-lysin gibt man 40 ml Oxalylchlorid. Die auf einem Ölbad bei 90 °C erhitzte Mischung wird mit 40 ml 1,2-Dimethoxyäthan versetzt. Die Mischung wird weitere 2 h am Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft, erneut in 20 ml 1,2-Dimethoxyäthan gelöst und tropfenweise unter Eiskühlung mit 500 ml einer ätherischen Lösung von Diazomethan (330 mmol) versetzt. Man rührt die Mischung eine weitere Stunde. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft, in 250 ml wasserfreiem Methanol gelöst, mit einer Lösung von 3,4 g (14,8 mmol) Silberbenzoat in 50 ml Triäthylamin vermischt und 15 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Präzipitat wird durch Filtration gesammelt, in 100 ml Chloroform gelöst, durch Filtration von unlöslichen Materialien befreit und zur Trockene eingedampft. Man erhält 15,3 g (53% Ausbeute) Methyl-(S)-3,7-diphthaloylaminoheptanoat; Zersetzungspunkt 118 bis 119 °C, $[\alpha]^{22}_D = -3^\circ$ (C 2, Chloroform).

Zu 15,0 g (34,5 mmol) Methyl-(S)-3,7-diphthaloylaminoheptanoat gibt man 100 ml 1 M alkoholisches Hydrazinhydrat und 100 ml 95%iges Äthanol. Die Mischung wird 1 h am Rückfluss erhitzt (bei einer Ölbadtemperatur von 90 °C). Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft, in 250 ml 5%iger Chlorwasserstoffsäure gelöst, 1 h bei 80 °C erhitzt, durch Zugabe von 17%igem wässrigem Ammoniak auf pH 7,1 eingestellt und durch eine mit 300 ml Amberlite® CG-50 (70% NH_4 -Typ) bepakte Säule (27 mm Innendurchmesser) geleitet. Die Säule wird mit jeweils 900 ml Wasser und 0,2 M wässrigem Ammoniak gewaschen und mit 0,5 M wässrigem Ammoniak eluiert. Die gegenüber dem Ninhydrin-Test positiven Fraktionen werden gesammelt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 3,15 g (57% Ausbeute)

(S)-3,7-Diaminoheptansäure ($C_7H_{16}N_2O_2 \cdot 1/4H_2CO_3$); $[\alpha]^{21}_D = +29^\circ$ (C 1, Wasser).

(b) Synthese von (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid

In 30 ml eines Gemisches aus Pyridin-Wasser-Triäthylamin (10:10:1, ausgedrückt durch das Volumen) löst man 3,1 g (19,3 mmol) (S)-3,7-Diaminoheptansäure, erhalten in obiger Stufe (a). Zu der gebildeten Lösung gibt man allmählich 4,81 g (19,3 mmol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid. Die Mischung wird 5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft, in 30 ml Wasser gelöst, mit 6n Chlorwasserstoffsäure auf pH 6,4 eingestellt, durch eine mit 100 ml Amberlite® CG-50 (80% NH_4 -Typ) bepakte Säule (16 mm Innendurchmesser) geleitet und mit 300 ml Wasser entwickelt. Der Abstrom wird gesammelt und durch eine mit 100 ml Dowex® 50 W-X4 (H-Typ) bepakte Säule (16 mm Innendurchmesser) geleitet. Die Säule wird mit jeweils 300 ml Wasser und 0,2 M wässrigem Ammoniak gewaschen und mit 0,5 M wässrigem Ammoniak eluiert (10 ml Fraktionen). Die Fraktionen Nr. 16 bis 33 werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 2,73 g (48% Ausbeute) eines weissen Pulvers von (S)-3-Amino-7-benzylloxycarbonylamino-heptansäure ($C_{15}H_{22}N_2O_4 \cdot H_2O$; Zersetzungspunkt 143 bis 147°C, $[\alpha]^{22}_D = +14^\circ$ (C 1, Methanol). Die obige Säule aus Amberlite® CG-50 wird mit 0,5 M wässrigem Ammoniak eluiert. Man gewinnt 746 mg (24% Ausbeute) (S)-3,7-Diaminoheptansäure.

In 50 ml einer 33%igen wässrigen Essigsäurelösung löst man 2,7 g (9,17 mmol) (S)-3-Amino-7-benzylloxycarbonylaminoheptansäure. Unter Kühlen mit Eis versetzt man die Lösung langsam im Verlauf von 1 h mit einer Lösung von 1,9 g (27,51 mmol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser. Die Mischung wird 1 gerührt und 24 h bei 5°C stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wird mit 50 ml Wasser verdünnt und zweimal mit 50 ml Äthylacetat extrahiert. Der Extrakt wird über wasserfreiem Natriumsulfat extrahiert und zur Trockene eingedampft. Man erhält 2,16 g eines rohen Pulvers. Das rohe Pulver wird der Säulenchromatographie unterzogen, wobei man eine mit 200 g Silikagel (Wako-Gel® C-200) bepakte Säule (28 mm Innendurchmesser) und ein Gemisch von Chloroform, Methanol und konzentriertem Ammoniak (30:10:1, ausgedrückt durch das Volumen) als Entwicklungslösungsmittel verwendet. Die Fraktionen Nr. 51 bis 60 (jeweils 20 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 460 mg (17% Ausbeute) eines weissen Pulvers von (S)-7-Benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptansäure; Zersetzungspunkt 115 bis 117°C, $[\alpha]^{23}_D = +3^\circ$ (C 2, Methanol).

In 4 ml 1,2-Dimethoxyäthan löst man 450 mg (1,52 mmol) (S)-7-Benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptansäure. Unter Eiskühlung wird die Lösung tropfenweise mit 7 ml (4,56 mmol) einer Ätherlösung von Diazomethan versetzt. Die Mischung wird 30 min gerührt und dann zur Trockene eingedampft. Man erhält 461 mg (98% Ausbeute) Methyl-(S)-7-benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptanoat; $[\alpha]^{21}_D = +1^\circ$ (C 5, Methanol).

In 50 ml wasserfreiem Methanol löst man 450 mg (1,45 mmol) Methyl-(S)-7-benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptanoat. Die bei -10°C gekühlte Lösung wird mit gasförmigem Ammoniak gesättigt und 3 Tage in einem Einschmelzrohr bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockene eingedampft und der Chromatographie unterzogen, wobei man eine mit 50 g Sili-

kagel (Wako-Gel® C-200) bepakte Säule (20 mm Innendurchmesser) und als Entwicklungslösungsmittel ein Gemisch von Chloroform und Methanol (100:1, ausgedrückt durch das Volumen) verwendet. Die Fraktionen Nr. 82 bis 106 (jeweils 10 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 371 mg (87% Ausbeute) eines weissen Pulvers von (S)-7-Benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptanamid; Zersetzungspunkt 126 bis 127°C, $[\alpha]^{22}_D = -3^\circ$ (C 5, Methanol).

In einer Mischung von 10 ml 90%igem wässrigem Methanol und 0,01 ml Essigsäure löst man 350 mg (1,19 mmol) (S)-7-Benzylloxycarbonylamino-3-hydroxyheptanamid. Nach Zugabe von 50 mg 5%igem Palladium-auf-Kohlenstoff wird die Mischung 3 h bei Zimmertemperatur unter einem Wasserstoffstrom gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird das Filtrat zur Trockene eingedampft, erneut in einem geringen Volumen Wasser gelöst und durch eine mit 30 ml Dowex® 50W-X4 (H-Typ) bepakte Säule (12 mm Innendurchmesser) geleitet. Die Säule wird dann mit 90 ml Wasser gewaschen und mit 0,5 M wässrigem Ammoniak eluiert. Die Fraktionen Nr. 28 bis 34 (jeweils 3 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 201 mg (96% Ausbeute) (S)-7-Amino-3-hydroxyheptanamid; $[\alpha]^{22}_D = -2^\circ$ (C 2, Wasser).

In 3 ml Wasser löst man 190 mg (1,08 mmol) (S)-7-Amino-3-hydroxyheptanamid und gibt 0,54 ml 2n wässrige Natriumhydroxidlösung zu. Im Verlauf von 30 min versetzt man die Lösung unter Eiskühlung tropfenweise mit 1 ml einer Methanollösung mit einem Gehalt von 129 mg (1,08 mmol) 2-Methyl-1-nitrosoharnstoff. Die Mischung wird weitere 5 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 6n Chlorwasserstoffsäure auf einen pH von 6,0 eingestellt, dann zur Trockene eingedampft und durch Chromatographie gereinigt, wobei man eine mit 30 g Silikagel (Wako-Gel® C-200) bepakte Säule (15 mm Innendurchmesser) und als Entwicklungslösungsmittel eine Mischung von Chloroform, Methanol und konz. wässrigem Ammoniak (60:10:1, ausgedrückt durch das Volumen) verwendet. Die Fraktionen Nr. 67 bis 90 (jeweils 6 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 187 mg (70% Ausbeute) eines weissen Pulvers von (S)-7-Nitroguanidino-3-hydroxyheptanamid; Zersetzungspunkt 148 bis 149°C, $[\alpha]^{22}_D = -2^\circ$ (C 2, Methanol).

In einem Gemisch aus 15 ml Wasser, 15 ml Methanol und 7,5 ml Essigsäure löst man 170 mg (0,69 mmol) (S)-7-Nitroguanidino-3-hydroxyheptanamid. Nach Zugabe von 50 mg 5%igem Palladium-auf-Kohlenstoff wird die Mischung 1 h bei Zimmertemperatur unter einem Wasserstoffstrom gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird das Filtrat zur Trockene eingedampft. Man erhält 165 mg rohes Pulver. Dieses Pulver wird in 10 ml Wasser gelöst, durch eine mit 20 ml CM-Sephadex® C-25 (Na-Typ) bepakte Säule (12 mm Innendurchmesser) geleitet und mit 0,5 M Natriumchloridlösung eluiert. Die Fraktionen Nr. 18 bis 25 (jeweils 2 ml Volumen) werden kombiniert und zur Trockene eingedampft. Die getrocknete Substanz wird dreimal mit 10 ml Methanol extrahiert. Die Methanolextrakte werden vereinigt, durch eine mit 100 ml Sephadex® LH-20 bepakte Säule (20 mm Innendurchmesser) geleitet und mit Methanol entwickelt. Die Fraktionen Nr. 28 bis 46 (jeweils 1 ml Volumen) werden vereinigt und zur Trockene eingedampft. Man erhält 149 mg (91% Ausbeute) eines weissen Pulvers von (S)-7-Guanidino-3-hydroxyheptanamid-hydrochlorid ($C_8H_{18}N_4O_2 \cdot HCl$); $[\alpha]^{22}_D = -2^\circ$ (C 2, Wasser).