

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 584 077

②1 N° d'enregistrement national : **85 09931**

⑤1 Int Cl⁴ : C 07 K 5/08, 5/06; A 61 K 37/02; C 12 P 21/02.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②7 Date de dépôt : 28 juin 1985.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 2 janvier 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société à responsabilité limitée dite :
INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGI-
QUES APPLIQUEES (I.R.C.E.B.A.). — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Odile Chasserey, Claude Rousseau, Jean-
Yves Lacolle, Monique Le Breton, Jean-Luc Morinière et
Bernard Danree.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 L-di ou tripeptides possédant une activité biologique utilisable en médecine humaine et vétérinaire, procédé pour
leur obtention et médicament en contenant.

⑤7 La présente invention concerne un procédé de synthèse
de di ou tripeptides phosphoniques de configuration L par
réaction d'un α -aminoacide ou d'un dipeptide carboxylique
avec un acide α -aminophosphonique ou d'un acide α -amino-
carboxylique avec un dipeptide phosphonique de configuration
L, la réaction étant réalisée en présence d'une enzyme telle
que la papaine avec séparation de phase.

Elle concerne également les produits nouveaux obtenus et
les médicaments contenant lesdits di ou tripeptides phospho-
niques.

FR 2 584 077 - A1

L-di ou tripeptides possédant une activité biologique utilisable en médecine humaine et vétérinaire, procédé pour leur obtention et médicament en contenant.

La présente invention concerne des L-di ou tripeptides à propriétés biologiques ; elle concerne également un procédé de préparation de L-di ou tripeptides possédant lesdites propriétés et enfin elle concerne les médicaments à activité antibactérienne contenant un di ou tripeptide de ce type.

On a déjà décrit, par exemple dans le brevet US 4016148 et dans le brevet français 79 16924, des polypeptides, en particulier des di et tripeptides qui possèdent des propriétés antibactériennes particulièrement intéressantes. Ces polypeptides antibactériens ont une configuration L.

La préparation de composés à configuration exclusivement L est difficile et onéreuse lorsque l'on utilise des méthodes de chimie classique. Il a été préconisé, pour certains polypeptides obtenus à partir d'acides aminés carboxyliques, de faire appel à une catalyse enzymatique, l'enzyme utilisée étant par exemple du type chymotrypsine.

Il a été trouvé et c'est là un objet de la présente invention que l'on pouvait avantageusement effectuer la synthèse de di ou tripeptides phosphoniques de configuration L avec des vitesses de réaction et de rendements importants en utilisant une catalyse enzymatique au moyen d'une protéinase à thiol choisie parmi la papaïne, la bromélaïne et la ficine.

La présente invention concerne donc un procédé de synthèse de di ou tripeptides phosphoniques de configuration L par réaction d'un α -aminoacide ou d'un dipeptide carboxylique avec un acide α -aminophosphonique ou d'un acide α -aminocarboxylique avec un dipeptide phosphonique de configuration L, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- On met en contact dans un milieu solvant aqueux un réactif choisi parmi un acide α -aminé ou un dipeptide carboxylique de configuration L formé par la condensation de deux acides α -aminocarboxyliques L ou DL avec un réactif choisi parmi les acides α -aminophosphoniques de configuration DL ou les dipeptides phosphoniques de configuration L formés par la condensation d'une molécule dudit acide α -aminophosphonique avec un acide α -aminocarboxylique,

ledit contact étant réalisé en utilisant au moins deux moles de l'acide α -aminé à fonction phosphonique de configuration L pour une mole de l'acide α -aminocarboxylique ou d'un dipeptide de configuration L, en présence d'une enzyme choisie parmi la papaïne, la bromélaïne et la ficine-et que l'on effectue la réaction en milieu acide, à une température comprise entre environ 10 et environ 70°C de façon à obtenir une séparation de phase entre le milieu réactionnel et le polypeptide formé.

Par solvant aqueux, on indique un liquide contenant de l'eau et dans lequel les réactifs de départ sont solubles. Ce solvant peut être notamment et de préférence constitué par de l'eau pure mais il peut être également constitué d'un solvant miscible à l'eau dans lequel on a ajouté la quantité d'eau nécessaire pour permettre la réalisation de la catalyse enzymatique.

Comme réactif de départ, on peut utiliser l'un des produits de chacune des classes suivantes :

A). un aminoacide carboxylique qui est soit un produit de configuration L, soit un mélange de produits de configuration L et D ;

. un dipeptide constitué par la réunion de deux aminoacides carboxyliques, ledit dipeptide étant en configuration L.

B). un acide alphaaminophosphonique de formule



dans laquelle R_1 est H ou un radical alkyle (plus particulièrement le radical CH_3) ou aryle ; ledit acide pouvant être, lorsqu'il comporte un atome de carbone asymétrique, soit de forme L, soit constitué par un mélange de forme L et D.

. un dipeptide phosphonique constitué par la réunion d'un acide alphaaminophosphonique tel que défini ci-dessus avec un α -aminoacide carboxylique, étant entendu que ledit dipeptide phosphonique est de configuration L.

Les aminoacides de la classe A sont utilisés avec blocage de leur fonction amine et les aminoacides de la classe B

sont utilisés sous forme d'esters (notamment éthylique). La réaction réalisée dans l'invention consiste donc dans la formation d'une fonction amide par réaction de la fonction acide de l'acide de la classe A avec la fonction amine de l'acide de la classe B.

5 La concentration d'acide de type B de structure L devra être, en moles, d'au moins deux fois celle de l'acide de type A et de structure L.

La réaction est réalisée à une température comprise entre environ 10 et environ 70°C ; en fait la limite inférieure de la température correspond à une température à laquelle la réaction est trop lente notamment au stade industriel et la limite supérieure de la température correspond à la température de stabilité de l'enzyme utilisée.

15 Il est à noter que, contrairement à de nombreuses réactions enzymatiques, la réaction selon l'invention se déroule en milieu acide à un pH compris entre environ 4 et environ 5,5.

La quantité d'enzyme utilisée peut être variable ; il a été trouvé que la vitesse et le rendement final de la réaction augmentaient progressivement au fur et à mesure que la quantité d'enzyme utilisée augmente de 10 à environ 100 % de la quantité d'acide carboxylique ou de dipeptide carboxylique (classe A) en configuration L utilisée comme produit de départ. Au-delà de cette quantité de 100 %, la vitesse et le rendement de la réaction varient peu.

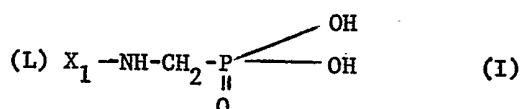
25 Comme indiqué ci-dessus, la réaction doit être effectuée dans des conditions où le produit formé (di ou tripeptide) forme une phase distincte de celle constituée par le solvant aqueux de départ. Cette constitution de phase distincte peut se réaliser spontanément lorsque le produit formé précipite hors dudit milieu sous forme d'un solide ou d'une huile (cette dernière se déposant par exemple contre les parois du récipient dans lequel la réaction est effectuée) ; mais on peut également être amené à réaliser la réaction en présence d'un milieu biphasique constitué d'une part par le solvant aqueux mentionné et
30 d'autre part par un liquide non miscible avec ledit solvant aqueux
35 mais dans lequel le produit formé est très soluble.

La présente invention concerne également les produits obtenus en mettant en oeuvre le procédé selon l'invention ; lesdits produits sont soit des produits connus qui avaient été synthétisés par d'autres procédés, soit des produits nouveaux.

Les produits obtenus peuvent être classés en quatre familles :

I. Dipeptides dérivés de l'acide aminométhylphosphonique.

Ces dipeptides répondent à la formule générale

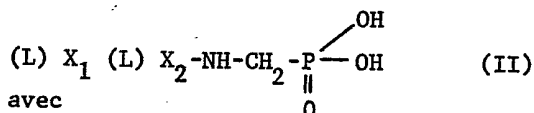


avec

$X_1 = \text{Sar, Gly, Ala, Phe, Leu, Tyr, 3-NO}_2\text{-Tyr, 4-F-Phe, 4-Cl-Phe, 4-NO}_2\text{-Phe, 4-NH}_2\text{-Phe, 2,4-Cl-Phe, 3,4-Cl-Phe, } \beta\text{-Me-Phe, } \alpha\text{-Me-Ala.}$

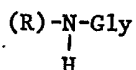
II. Tripeptides dérivés de l'acide aminométhylphosphonique.

Ces tripeptides répondent à la formule générale :



avec

$X_1 = \text{Gly, Ala, Phe, Leu, Tyr, (R}_1\text{-R}_2\text{)-Phe, Sar,}$



$X_2 = \text{Gly, Ala, Phe, Leu, Tyr, (R}_1\text{-R}_2\text{)-Phe,}$

$(R_1\text{-R}_2\text{)-Tyr}$

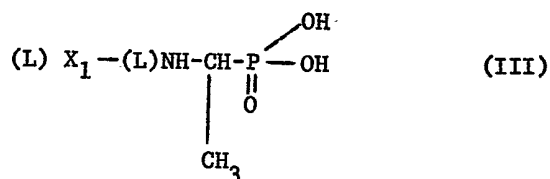
$R = \text{Alkyl, Aryl, Acyl } R_1, R_2 = \text{NO}_2, \text{NH}_2, \text{Halo-}$

gène, Alkyl, Aryl

III. Dipeptides dérivés de l'acide (L) (amino-1)

éthylphosphonique.

Ces dipeptides répondent à la formule générale :



avec

(R₁-R₂)-Tyr

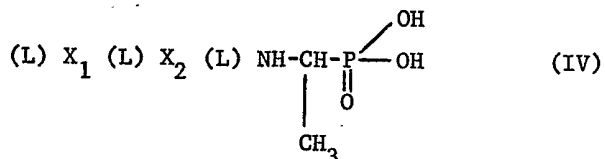
X₁ = Sar, Gly, Ala, Phe, Leu, Tyr, (R₁-R₂)-Phe,

R₁ et R₂ étant tels que définis ci-dessus.

IV. Tripeptides dérivés de l'acide L-(amino-1)-

5 éthylphosphonique.

Ces tripeptides répondent à la formule générale :



10

avec

X₁ = (R)-N-Gly, Sar, Gly, Ala, Leu, Phe, Tyr,
(R₁-R₂)-Phe, (R₁-R₂)-Tyr H

X₂ = Gly, Ala, Leu, Phe, Tyr, (R₁-R₂)-Phe, (R₁-R₂)-

15 Tyr,

R = Alkyl, Aryl, Acyl

R₁, R₂ = NO₂, NH₂, Halogène, Alkyl, Aryl

Dans chacune de ces familles, on citera comme
produits nouveaux synthétisés les composés suivants :

20

- composés de formule (I)

B 951 Acide L-(Fluoro-4)-Phénylalanyl-amino-
méthylphosphonique,

B 997 Acide L-(Nitro-3)-Tyrosyl-aminométhyl-
phosphonique,

25

B 986 Acide L-(Amino-4)-Phénylalanyl-amino-
méthylphosphonique,

B 932 Acide L-(Dichloro-2,4)-Phénylalanyl-
aminométhylphosphonique,

30

B 952 Acide L-(Dichloro-3,4)-Phénylalanyl-
aminométhylphosphonique,

B 968 Acide L-L(β-Méthyl)-Phénylalanyl-amino-
méthylphosphonique,

B 934 Acide (α-Méthyl)-Alanyl-aminométhyl-
phosphonique,

35

- composés de formule (II)

B 980 Acide Glycyl-L-Valyl-aminométhylphospho-
nique,

- méthylphosphonique,
 phosphonique,
 5 phosphonique,
 phosphonique,
 phosphonique,
 10 éthylphosphonique,
 phosphonique,
 15 éthylphosphonique,
 éthylphosphonique,
 20 éthylphosphonique,
 éthylphosphonique,
 25 éthylphosphonique,
 Tous les produits synthétisés (connus ou nouveaux)
 possèdent notamment une même propriété pharmacologique de base : ce
 sont des antibactériens présentant une activité contre une large gamme
 de bactéries gram-positives et gram-négatives.
 Comme la toxicité de ces produits est très
 30 faible ou nulle, les produits sont utilisables dans des médicaments
 à administration orale ou parentérale ; la quantité de principe
 actif par unité de prise est comprise entre 100 et 2000 mg.
 Les exemples non limitatifs suivants illustrent
 le procédé selon l'invention.
- B 996 Acide L-Phénylalaninyl-L-Leucyl-amino-
 B 994 Acide L-Leucyl-L-Leucyl-aminométhyl-
 B 995 Acide Glycyl-L-Tyrosyl-aminométhyl-
 B 1005 Acide L-Alanyl-Sarcosyl-aminométhyl-
 - composé de formule (III)
 B 1033 Acide L-(Nitro-3)-Tyrosyl-L-(Amino-1)-
 - composé de formule (IV)
 B 989 Acide L-Alanyl-L-Leucyl-L-(Amino-1) éthyl-
 B 1004 Acide Sarcosyl-L-Phénylalaninyl-L-(Amino-1)-
 B 1022 Acide L-Leucyl-L-Phénylalaninyl-L-(Amino-1)-
 B 1030 Acide L-Leucyl-L-Leucyl-L-(Amino-1)-
 B 1035 Acide Sarcosyl-L-Leucyl-L-(Amino-1)-
 B 1002 Acide L-Leucyl-L-Alanyl-L-(Amino-1)-

Exemple 1

Synthèse de l'acide (L) Alanyl-(amino-1)-éthylphosphonique.

Cet exemple servant de référence les opérations
5 successives y seront décrites en détail.

I. Synthèse et induction asymétrique de
l'ester éthylique de l'acide (N-benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-
(amino-1)-éthylphosphonique.

Dans un réacteur de 2 l équipé d'une agitation
10 efficace d'un thermomètre et sous balayage d'azote, on introduit
successivement :

- 100 ml de soude normale (0,1 mole)
- 22,3 g de (N-benzyloxycarbonyl)-L-Alanine
(0,1 mole) [0,36 M]
- 15 - 72,4 g d'ester éthylique de l'acide DL-
(amino-1)-éthylphosphonique (0,4 mole) [0,72 M]
- 1,17 g de chlorhydrate de L-cystéine
- 117 ml de solution tampon citrique à pH : 4,5.

Le milieu réactionnel limpide dont le pH est
20 6,92 est porté à 50°C par l'intermédiaire d'un bain-marie thermo-
staté.

A cette température, on additionne une solution
de 22 g de papaïne (70 nkat/mg) dans 30 ml d'eau. Le pH évolue lente-
ment et se stabilise à 6,84.

25 Par addition d'acide citrique en poudre (m = 40 g)
on amène le pH à 4,53 (pH compris entre 4,5 et 4,6). A ce stade, la
solution est limpide.

On introduit alors sous bonne agitation 700 ml
de tétrachlorure de carbone.

30 L'avancement de la réaction et la cinétique sont
suivis en HPLC en injectant toutes les heures 1 µl de solution orga-
nique sur une colonne RP 18, 5 µ (MERCK) en éluant par un mélange
(MeOH : 67 ; H₂O : 30 ; NH₄OH conc. : 3) - (V_R = 7,2 - 7,4 ml).

Au bout de 15 h (temps de réaction compris
35 entre 10 et 15 h), la synthèse est terminée ; à ce stade, la
concentration du produit est environ 0,13 molaire dans la phase
organique.

On refroidit le milieu réactionnel, décante les deux phases et lave la phase organique à l'eau puis la concentre à sec après séchage sur sulfate de sodium :

$$m = 45 \text{ g}$$

- 5 Le résidu est repris par 500 ml de chloroforme ; après lavages successifs à l'acide chlorhydrique à 5 % (150 ml), à l'eau (150 ml), à la soude 0,1 N (150 ml) puis à l'eau 200 ml jusqu'à pH : 6,5, on concentre à sec sous vide.

- 10 On obtient 36,7 g (0,095 mole) du produit cherché, soit un rendement de 95 % ; le produit obtenu présente, dans le méthanol, un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$)

II. Synthèse de l'acide L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique optiquement pur :

- 15 L'huile obtenue est dissoute dans cinq volumes d'une solution d'acide bromhydrique à 33 % dans l'acide acétique soit 180 ml. La solution est laissée sous agitation pendant 5 h à la température ambiante puis versée sur 800 ml d'éther sulfurique ; après cristallisation du bromhydrate de l'acide L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique sur les parois du récipient, on décante la phase
20 éthérée et reprend le résidu par 180 ml de méthanol.

A cette solution limpide, on ajoute 22 ml d'oxyde de propylène dissous dans 35 ml de méthanol. Un précipité apparaît rapidement et on le laisse cristalliser pendant 2 h à 0°C. On filtre, lave au méthanol et sèche à l'étuve sous vide à 60°C.

- 25 On obtient 18,1 g (0,0921 mole) du produit, soit un rendement de 97 % ; ledit produit présente, dans l'eau, un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$)

- 30 Le solide obtenu est dissous dans 65 ml d'eau bouillante et, à la solution décolorée par du noir animal 2 SA, on ajoute à 70°C 130 ml d'éthanol sous bonne agitation.

Un précipité cristallin apparaît au refroidissement à la température ambiante. Au bout de 2 h à 0°C, on filtre et sèche le produit à l'étuve sous vide à 60°C.

- 35 On obtient 12,65 g (0,0645 mole) du produit cherché soit un rendement de 70 % ; ledit produit présente une température de fusion de 289-292°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$)

Le rendement global en L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique optiquement pur exprimé par rapport au (N-benzyl-carbonyl)-L-Alanine est 64 %.

III. Recyclage de l'ester éthylique de l'acide

5 (amino-1)-éthylphosphonique après épimérisation :

La phase aqueuse du milieu réactionnel enzymatique, soit environ 250 ml [qui contient 55,2 g (0,305 mole) de l'ester éthylique de l'acide (amino-1)-éthylphosphonique], est acidifiée par l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à normalité finale de 6 N.

10 On porte au reflux cette solution pendant 5 h ; après refroidissement, on décolore par passage sur noir 2 SA et élimine les impuretés minérales et organiques par percolation sur une colonne de résine S 861 (DUOLITE).

Les éluats acides sont concentrés à sec sous vide. Le résidu est dissous dans 100 ml de méthanol auquel on ajoute, sous bonne agitation, de la pyridine sèche, jusqu'à pH : 4,5.

Le précipité abondant qui apparaît est laissé à 0°C pendant 2 h.

20 On obtient ainsi 37 g (0,296 mole) d'acide DL (amino-1)-éthylphosphonique.

Le produit obtenu a un point de fusion supérieur à 260°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ (c = 1)

On estérifie ce composé par les méthodes usuelles et, après distillation, on obtient 43,8 g (0,242 mole) d'ester éthylique de l'acide DL-(amino-1)-éthylphosphonique que l'on peut recycler.

25 Exemple 2

Synthèse de l'acide (L) phénylalananyl-aminométhylphosphonique.

Dans un erlenmeyer de 500 ml équipé d'un thermomètre et d'une agitation magnétique, on introduit :

30 - 33 ml de soude normale (0,033 mole)
- 10 g de (N-benzylloxycarbonyl)-DL-phénylalanine (0,033 mole),

- 5,51 g d'ester éthylique de l'acide amino-méthylphosphonique (0,033 mole).

35 A cette solution limpide, on additionne 0,420 g de chlorhydrate de cystéine, 42,5 ml de tampon citrique à pH : 4,5 et 60 ml d'eau.

La concentration des substrats est 0,22 molaire, le pH est compris entre 7,3 et 7,6.

Le mélange est porté à 40°C et on ajoute 5 g de papaïne (à 70 n Kat/mg) dissoute dans 45 ml d'eau. Le pH est amené à 5,5 par addition d'acide citrique en poudre (m = 10 g).

Le milieu réactionnel se trouble légèrement et une huile, qui cristallise lentement, se dépose sur les parois. On laisse la réaction se poursuivre pendant 8 h à 50°C.

L'analyse chromatographique montre que, dès le début, le dépôt est le dipeptide.

On refroidit, extrait par 3 x 50 ml de chloroforme et lave les phases organiques jointes à l'eau, à la soude 0,1 N puis à l'eau.

On sèche sur sulfate de sodium et concentre à sec. L'ester éthylique de l'acide (N-benzyloxycarbonyl)-L-phénylalaninyl-aminométhylphosphonique cristallise.

On a obtenu 6,23 g (0,0139 mole) de l'ester, soit un rendement de 84 % ; le produit obtenu présentait une température de fusion (banc kofler) de 102-104°C et un pouvoir rotatoire dans l'éthanol de $[\alpha]_D^{20} = -9,8^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

Le produit précédent est repris par 35 ml d'une solution à 33 % d'acide bromhydrique dans l'acide acétique ; le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 h, puis versé sur 260 ml d'éther sulfurique. Après cristallisation du bromhydrate de l'acide L-phénylalaninyl-aminométhylphosphonique sur les parois du récipient, on décante la phase étherée et reprend le résidu par 30 ml de méthanol. On ajoute 4 g d'oxyde de propylène dissous dans 8 ml de méthanol. Un précipité cristallin se forme rapidement ; après 2 h à 0°C, on filtre et sèche à l'étuve sous vide à 60°C. On obtient ainsi 3,2 g d'acide L-phénylalaninyl-aminométhylphosphonique optiquement pur.

L'acide obtenu (rendement 89,2 %) présente un point de fusion de 265-268°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = +74,8^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

De la même façon, on peut récupérer et recycler, à partir de la phase aqueuse enzymatique, l'excès de l'ester éthylique de l'acide aminométhylphosphonique (cf. exemple 1).

Exemple 3

Synthèse de l'acide (L) Leucyl-aminométhylphosphonique.

Dans un erlenmeyer de 500 ml muni d'un thermomètre et d'une agitation magnétique, on introduit :

- 5 - 20 ml de soude normale (0,020 mole)
 - 5,3 g de (N-benzyloxycarbonyl)-L-Leucine (0,020 mole),
 - 6,2 g de l'ester éthylique de l'acide aminométhylphosphonique (0,037 mole),

- 10 A la solution limpide, on ajoute 240 mg de chlorhydrate de cystéamine dissous dans 5,7 ml d'eau, puis 24 ml de tampon citrique à pH : 4,5 et 100 ml d'eau. La solution est à pH : 7,53.

- On chauffe à 40°C par l'intermédiaire d'un
15 bain-marie thermostaté et ajoute 1,71 g de papaïne (à 26 n Kat/mg) dissous dans 21 ml d'eau ; le pH évolue à 7,25.

 Par addition d'acide citrique (m = 8 g), le pH est amené à 5,6. Très rapidement une huile décante sur les parois du récipient et cristallise lentement.

- 20 Au bout de 8 h, on refroidit et extrait le précipité formé par 120 ml de chlorure de méthylène. Après lavages successifs par 30 ml d'eau, 30 ml d'acide chlorhydrique à 5 %, 30 ml d'eau, 30 ml de soude 0,1 N et 30 ml d'eau (pH : 6,5) la phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée à sec.

- 25 On obtient ainsi 6,9 g de l'ester éthylique de l'acide L-Leucyl-aminométhylphosphonique. Cet ester a un point de fusion (banc kofler) de 82-83°C et un pouvoir rotatoire dans le méthanol de $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

- Ce produit est repris par 33 ml de solution
30 d'acide bromhydrique à 33 % dans l'acide acétique et laissé sous agitation pendant 6 h. On ajoute 250 ml d'éther sulfurique et le résidu décanté est dissous dans 30 ml de méthanol. On ajoute 6 ml de méthanol et 3,5 ml d'oxyde de propylène.

- Un précipité apparaît qu'on laisse cristalliser
35 pendant 2 h à 0°C. On filtre et sèche sous vide à 60°C.

On obtient ainsi 3,54 g d'acide L-Leucyl-amino-méthylphosphonique.

L'acide obtenu a une température de fusion de 243-247°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = +60,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

5 Dans le cas de l'utilisation d'un solvant organique chloré, le temps de réaction est de 6 h et le rendement est voisin de 85 %.

Exemple 4

Synthèse de l'acide L-Alanyl-L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique.

10 I. Synthèse de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine :

a) Synthèse de l'ester éthylique de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanine.

15 Dans un erlenmeyer de 500 ml équipé d'une agitation magnétique d'un thermomètre et d'un réfrigérant à eau, on introduit :

- 20 g de (N-Benzyloxycarbonyl)-DL-Alanine

(0,0897 mole),

- 45 ml de soude 2 N,

20 - 0,54 g de chlorhydrate de L-cystéine,

- 54 ml de solution tampon citrique à pH : 4,5.

La solution est portée à 50°C ; à cette température le pH est 5,3. On ajoute 10 g de papaïne (à 70 n Kat/mg) ; au bout de quelques minutes le pH évolue vers 5,20.

25 Par addition d'acide citrique en poudre (m : 8,5 g), on amène le pH à 4,53.

Au milieu réactionnel, on ajoute une solution de 4,5 g d'éthanol (0,098 mole) dans 160 ml de chloroforme.

30 La réaction d'estérification est suivie en HPLC (colonne RP 18, 5 μ MERCK ; solvant : MeOH/H₂O/NH₄OH conc. = 67/30/3 ; V_R = 7,8 - 8 ml). Au bout de 90 min, la réaction n'évolue plus.

On refroidit et décante les phases ; la phase aqueuse est extraite par 2 x 100 ml de chloroforme ; les phases 35 chloroformiques jointes sont lavées par 100 ml d'acide chlorhydrique

à 5 %, 100 ml d'eau, 100 ml de bicarbonate de sodium à 5 % puis
2 x 100 ml d'eau jusqu'à pH = 6,5.

Après séchage sur sulfate de sodium, on concentre
à sec.

5 On obtient ainsi 0,030 mole de l'ester éthylique
de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanine.

L'ester obtenu est une huile dont le pouvoir
rotatoire, dans le méthanol, est : $[\alpha]_D^{20} = -30,7^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

b) Synthèse de l'ester éthylique de l'acide
10 (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine.

Après déprotection du produit précédent par
une solution d'acide bromhydrique à 37 % dans l'acide acétique
[d'après J.R. COGGINS, N.L. BENOITON Can. J. Chem. (1971) 49 1968],
on obtient 3,16 g d'ester éthylique de la L-Alanine (0,027 mole,
15 Rdt : 90 %).

Dans un erlenmeyer de 250 ml, on introduit :

- 9,62 g de (N-Benzyloxycarbonyl)-DL-Alanine
(0,043 mole),

- 21,5 ml de soude 2 N,
20 - 3,16 g d'ester éthylique de la L-Alanine
(0,027 mole),

- 0,26 g de chlorhydrate de cystéamine,
- 26 ml de solution tampon citrique à pH = 4,5.

On chauffe la solution à 50°C et, à cette tempé-
25 rature, on ajoute 4,8 g de papaïne (à 70 n Kat/mg) ; le pH évolue
lentement vers 5,9.

Par addition d'acide citrique en poudre, on
ajuste le pH à 4,52, puis on introduit, sous bonne agitation, 120 ml
de chloroforme.

30 La réaction suivie en HPLC, comme dans les
exemples précédents, est complète en 6 h.

La phase organique, traitée comme dans l'exemple
4-I-a donne 6,23 g de l'ester éthylique de l'acide (N-benzyloxy-
carbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine.

35 m = 6,23 g (0,01935 mole) huile

c) Synthèse de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine.

Le composé précédent traité par une solution méthanolique de soude 2 N [selon J.R. COGGINS, N.L. BENOITON Can. J. Chem. (1971) 49 1968] donne 5,4 g de (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine.

On a obtenu 5,4 g (0,0184 mole) d'un produit dont le point de fusion est de 152-154°C et le pouvoir rotatoire dans le méthanol de $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,5)

II. Synthèse de l'ester éthylique de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique.

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit successivement :

- 5,29 g de (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanine (0,018 mole),
- 9 ml de soude 2N,
- 13 g de l'ester éthylique de l'acide DL-(amino-1)-éthylphosphonique (0,072 mole),
- 0,28 g de chlorhydrate de L-cystéine,
- 28 ml de tampon citrique à pH : 4,5,
- 5 g de papaïne (à 70 n Kat/mg).

Selon le procédé décrit dans l'exemple 1-I et, après 10 h de réaction, on obtient l'ester éthylique de l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Alanyl-L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique [F° : 127-129°C ; $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ \pm 2^\circ$ (1, méthanol)] que l'on déprotège selon le procédé décrit en 1-II pour obtenir après recristallisation 2,73 g d'acide L-Alanyl-L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique optiquement pur.

Le produit obtenu a un point de fusion de 277-279°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = -58,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

L'excès de substrat phosphoné est récupéré et recyclé selon l'exemple 1-III à partir de la phase aqueuse du milieu réactionnel enzymatique (m = 7,24 g, Rdt : 74 %).

Exemple 5

En opérant comme ci-dessus, on a pu obtenir notamment les produits suivants :

a) En condensant l'acide (N-Benzyloxycarbonyl)-L-Leucyl-Leucine avec l'ester éthylique de l'acide DL-(amino-1)-éthylphosphonique, on obtient l'acide L-Leucyl-L-Leucyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique avec un rendement global de 64,5 %.

5 Le produit obtenu présente un point de fusion de 238-240°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

b) L'acide Sarcosyl-L-Alanyl-L-(amino-1)-éthylphosphonique qui a un point de fusion de 243-247°C et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = -83,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

10 c) L'acide Glycyl-L-Tyrosyl-aminométhylphosphonique ayant un point de fusion d'environ 300°C (avec décomposition) et un pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1)

d) l'acide L-(Nitro-3)-tyrosyl-aminométhylphosphonique/F° 255-257°C/pouvoir rotatoire dans la soude 0,1 N de $[\alpha]_D^{20} = +9,7^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,25)

e) L'acide glycyl-L-Valyl-aminométhylphosphonique/F° = 278-281°C/pouvoir rotatoire dans l'eau de $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,5).

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse de di ou tripeptides phosphoniques de configuration L par réaction d'un α -aminoacide ou d'un dipeptide carboxylique avec un acide α -aminophosphonique ou un acide α -aminocarboxylique avec un dipeptide phosphonique de configuration L, ledit
5 procédé étant caractérisé en ce que :

- on met en contact dans un milieu solvant aqueux un réactif choisi parmi un acide α -aminé ou un dipeptide carboxylique de configuration L formé par la condensation de deux acides α -aminocarboxyliques L ou DL avec un réactif choisi parmi les acides
10 α -aminophosphoniques de configuration DL ou les dipeptides phosphoniques de configuration L formés par la condensation d'une molécule dudit acide α -aminophosphonique avec un acide α -aminocarboxylique, ledit contact étant réalisé en utilisant au moins deux
15 moles de l'acide amine à fonction phosphonique de configuration L pour une mole de l'acide aminocarboxylique ou de dipeptide de configuration L, en présence d'une enzyme choisie parmi la papaïne, la bromélaïne et la ficine et que l'on effectue la réaction en milieu acide, à une température comprise entre environ 10 et environ 70°C,
20 et de façon à obtenir une séparation de phase entre le milieu réactionnel et le polypeptide formé.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'enzyme utilisée est la papaïne.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé
25 en ce que la séparation de phase entre le milieu réactionnel et le polypeptide formé est réalisée par utilisation d'un liquide non miscible audit milieu mais dans lequel le produit obtenu est soluble.

4. Di et tripeptides phosphoniques, caractérisés en ce
30 qu'ils sont obtenus selon le procédé décrit dans l'une des revendications 1 à 3.

5. Médicaments, caractérisés en ce qu'ils contiennent comme produit actif un produit selon la revendication 4.

6. Produits peptidiques nouveaux, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi :

- Acide L-(Fluoro-4)-Phénylalanyl-aminométhylphosphonique,
- 5 Acide L-(Nitro-3)-Tyrosyl-aminométhylphosphonique,
Acide L-(Amino-4)-Phénylalanyl-aminométhylphosphonique,
- Acide L-(Dichloro-2,4)-Phénylalanylaminométhylphosphonique,
- 10 Acide L-(Dichloro-3,4)-Phénylalanylaminométhylphosphonique,
Acide L-L(β -Méthyl)-Phénylalanyl-aminométhylphosphonique,
- 15 Acide (α -Méthyl)-Alanyl-aminométhylphosphonique,
Acide Glycyl-L-Valyl-aminométhylphosphonique,
Acide L-Phénylalanyl-L-Leucyl-aminométhylphosphonique,
- 20 Acide L-Leucyl-L-Leucyl-aminométhylphosphonique,
Acide Glycyl-L-Tyrosyl-aminométhylphosphonique,
Acide L-Alanyl-Sarcosyl-aminométhylphosphonique,
Acide L-(Nitro-3)-Tyrosyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
- 25 Acide L-Alanyl-L-Leucyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
Acide Sarcosyl-L-Phénylalanyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
Acide L-Leucyl-L-Phénylalanyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
- 30 Acide L-Leucyl-L-Leucyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
Acide Sarcosyl-L-Leucyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique,
Acide L-Leucyl-L-Alanyl-L-(Amino-1)-éthylphosphonique.

35 7. Nouveaux médicaments à effets antibactériens, caractérisés en ce qu'ils contiennent comme principe actif au moins un produit selon la revendication 6.