



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 26.IV.1965 (P 108 563)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 31.X.1967

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

UKD

Współtwórcy wynalazku: Emil Taszner, Barbara Rzeszotarska, Łucja
Lubiewska

Właściciel patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania estrów N-chronionych peptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania estrów N-chronionych peptydów poprzez nowe estry aktywne N-chronionych aminokwasów lub peptydów.

W znanym sposobie otrzymywania peptydów poprzez aktywne estry p-nitrofenylowe produkt końcowy, obok poszukiwanego N-chronionego estru peptydu, zawiera ester p-nitrofenylowy N-chronionego aminokwasu użyty zwykle w nadmiarze, jak również p-nitrofenol, który powstał w reakcji. Z takiej mieszaniny bardzo trudno jest oddzielić poszukiwany ester N-chronionego peptydu od estru p-nitrofenylowego N-chronionego aminokwasu i p-nitrofenolu, przez co zarówno czystość jak i wydajność końcowego produktu są mało zadowalające.

Stwierdzono, że niedogodności te można ominąć, jeżeli zamiast estrów p-nitrofenylowych zastosuje się estry pirydylowe N-chronionych aminokwasów. Stosując estry pirydylowe można łatwo oddzielić ester N-chronionego peptydu od nieprzereagowanego estru pirydylowego i powstałej w reakcji hydroksypirydyny przez wymycie tych ostatnich kwasami.

Według wynalazku N-chronione aminokwasy lub peptydy przeprowadza się w estry pirydylowe przez aktywowanie ich grupy karboksylowej np. za pomocą dwucykloheksylokarbodiimidu lub za pomocą mieszanych bezwodników i następnie sprzęganie z hydroksypirydyną. Estry takie, w literatu-

2

rze nieznane, sprzęga się z estrami aminokwasów lub peptydów w środowisku rozpuszczalników organicznych lub wodno-organicznych ewentualnie w obecności katalizatorów takich, jak kwasy organiczne np. kwas octowy lub katalizatorów bifunkcyjnych jak np. pirazol, przyspieszających aminolizę. Otrzymuje się estry N-chronionych peptydów z dużą wydajnością i o wysokiej czystości.

Sposobem według wynalazku N-chroniony aminokwas lub peptyd i 3-hydroksypirydynę rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym, chłodzi do temperatury 0°C i dodaje ekwimolarną ilość dwucykloheksylokarbodiimidu. Reakcję prowadzi się w ciągu około pół godziny w temperaturze 0°C i w ciągu kilku godzin w temperaturze pokojowej, po czym odsąca się dwucykloheksylomocznik, a przesącz przemywa nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu i kilkakrotnie wodą. Po wysuszeniu, i odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem pozostaje ester w postaci oleju.

Sposobem według wynalazku omawiane estry można również otrzymać przez rozpuszczenie N-chronionego aminokwasu lub peptydu w rozpuszczalniku organicznym, oziębienie do temperatury -18°C i zadanie ekwimolarną ilością trzeciorzędowej aminy i ekwimolarną ilością chloromrówczanu etylu lub tlenochloru fosforu. W tym ostatnim przypadku dodaje się jeszcze 1 mol trzeciorzędowej aminy. Po 20 minutach dodaje się 3-hydroksypirydynę i całość pozostawia w lodówce na kilka-

naście godzin, przy czym otrzymuje się ester z dobrą wydajnością.

Otrzymane sposobem według wynalazku estry 3-pirydyłowe N-chronionych aminokwasów lub peptydów rozpuszcza się w octanie etylu lub innym rozpuszczalniku organicznym lub organiczno-wodnym, zadaje solami lub estrami aminokwasów lub peptydów i pozostawia, ewentualnie w obecności katalizatorów, w temperaturze pokojowej na przeciąg około 20 godzin. Po zakończeniu reakcji produkt wymywa się wodą, ln kwasem solnym, nasyconym roztworem kwaśnego węglańu sodu i na-

stępnie kilkakrotnie wodą. Po wysuszeniu środkiem suszącym rozpuszczalnik odpędza się pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się krystaliczny peptyd, którego temperatura topnienia już po jednej krystalizacji jest zgodna z danymi literaturowymi.

Poniżej podane tablice ilustrują sposób według wynalazku przy czym tablica 1 ilustruje sposób wytwarzania aktywnych estrów 3-pirydyłowych N-chronionych aminokwasów lub peptydów, a tablica 2 ich następną aminolizę estrami aminokwasów lub peptydów.

Tablica 1

Estry N-chronionych aminokwasów lub peptydów z 3-hydroksypirydyną

Lp	Hydroksy-związek	N-chroniony aminokwas lub peptyd	Metody otrzymywania estru	Wydajność %	N obliczono %	N znaleziono %
1	3-hydroksypirydyna	Z-Gly-OH	DCCI	76	9,79	9,48 9,78
2	„ „	Z-DL-Phe-OH	„	98	7,43	7,55 7,75
3	„ „	„	ClCOOEt	67	7,43	7,30 7,37
4	„ „	Z-L-Ala-OH	DCCI	94	9,33	9,30 9,65
5	„ „	For-L-Phe-OH	„	92	10,36	10,65 10,70
6	„ „	Z-Gly-DL-Phe-OH	„	87	9,66	9,57 9,65
7	„ „	Z-DL-Leu-Gly-OH	„	75	10,51	10,10 10,45

Tablica 2

Sprzęganie (Aminoliza) aktywnych estrów 3-pirydyłowych N-chronionych aminokwasów lub peptydów z estrami aminokwasów lub peptydów

Lp.	Ester aktywny	Ester aminokwasu lub peptydu	Otrzymane peptydy	Wydajność peptydu %	Temperatura topnienia	
					otrzymana °C	literaturowa °C
1	Z-Gly-3-CPy	HCl.DL-Phe-OEt	Z-Gly-Phe-OEt	80	90	92
2	Z-L-Ala-3-OPy	HCl.Gly-OEt	Z-L-Ala-Gly-OEt	88	94,5—96	97,5—98
3	Z-DL-Phe-3-OPy	HCl.Gly-OEt	Z-DL-Phe-Gly-OEt	87	104,5—107,5	109
4	For-L-Phe-3-OPy	L-Phe-OBu	For-L-Phe-Phe-OBu	45	122—123	*)
5	Z-Gly-DL-Phe-3-CPy	HCl.Gly-OEt	Z-Gly-DL-Phe-Gly-OEt	50	130,5	132—134
6	Z-DL-Leu-Gly-3-OPy	HCl.Gly-OEt	Z-DL-Leu-Gly-Gly-OEt	73	101	102
7	Z-L-Phe-3-OPy	HCl.L-Phe-OEt	Z-L-Phe-Phe-OEt	97	136—137	140
8	Z-L-Ala-3-OPy	TosCH.L-Glu(OBz) ₂	Z-L-Ala-Glu(OBz) ₂	96	99—100	104—105

*)analiza dla wzoru: C₂₃H₂₅O₄N₂

N obliczono 7,03%

N znaleziono 7,03%

7,15%

Wyjaśnienie używanych w tablicach symboli:

Z — osłona karbobenzoksy

For — osłona formylowa

OET — ester etylowy

OBu — ester trzeciorzędowy butylowy

OBz — ester benzylowy

3-OPy — ester 3-pirydyłowy

Ala — reszta alaniny

15 Glu — reszta kwasu glutaminowego

Gly — reszta glicyny

Leu — reszta leucyny

Phe — reszta fenyloalaniny

DCCI — dwucykloheksylokarbodwuimid

ClCOOEt — chloromrówczan etylu

DL — racemiczny

20 Tos — tosyl

Przykład I. 1,12 g (5 mM) karbobenzoksyalaniny rozpuszcza się w 10 ml octanu etylu dodaje 523 mg (5,5 mM) 3-hydroksypirydyny, chłodzi do temperatury 0°C dodaje 1,03 g (5mM) dwucykloheksylokarbodwuimidu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w ciągu pół godziny w temperaturze 0°C i 17 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym okresie dodaje się parę kropel kwasu octowego i po paru minutach odsącza osad dwucykloheksylomocznika. Przesącz poddaje się częściowemu odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem, dodaje octanu etylu i wymywa schłodzonym do temperatury 0° nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu i wodą. Po wysuszeniu za pomocą bezwodnego siarczany sodu i odpędzeniu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 94% estru w postaci oleju.

Analiza związku o wzorze: $C_{16}H_{16}O_4N_2$:

N obliczono 9,33%
N znaleziono 9,30%
9,65%

750 mg (2,5 mM) uzyskanego estru 3-pirydylowego karbobenzoksyalaniny rozpuszcza się w 5 ml octanu etylu, dodaje 382 mg (2,75 mM) chlorowodorku estru etylowego glicyny oraz 0,382 ml (2,75 mM) trójetiloaminy. Po 24 godzinach mieszaninę reakcyjną przemywa się wodą, 1 n kwasem solnym, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu i wodą. Po wysuszeniu za pomocą siarczany magnezu octan etylu odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 680 mg (88%) estru etylowego karbobenzoksyalanilo-glicyny. Temperatura topnienia surowego związku wynosi 94,5—96°C. (Temperatura topnienia związku według danych literaturowych wynosi 97,5—98°C.

Przykład II. 900 mg (3 mM) Karbobenzoksy-feniloalaniny rozpuszcza się w 6 ml czterohydrofuranu, dodaje 0,42 ml (3 mM) trójetiloaminy, chłodzi się do temperatury -18°C i dodaje 0,285 ml (3 mM) chloromrówczanu etylu. Po dwudziestu minutach dodaje się 315 mg (3,3 mM) 3-hydroksy-pirydyny i pozostawia przez noc w lodówce. Po odparowaniu czterohydrofuranu dodaje się octanu etylu i przerabia jak w przykładzie I. Otrzymuje się 67% estru w postaci oleju.

Analiza związku o wzorze $C_{22}H_{20}O_4N_2$:

N obliczono 7,43%
N znaleziono 7,37%
7,30%

940 mg (2,5 mM) estru 3-pirydylowego karbobenzoksyfeniloalaniny rozpuszcza się w 5 ml octanu etylu, dodaje 382 mg (2,75 mM) chlorowodorku estru etylowego glicyny oraz 0,382 ml (2,75 mM) trójetiloaminy.

Po 24 godzinach mieszaninę reakcyjną przemywa się wodą, 1 n kwasem solnym, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu i wodą. Po wysusze-

niu za pomocą siarczany magnezu octan etylu odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizuje z mieszaniny octan etylu/petrol. Otrzymuje się 840 mg (87%) estru etylowego karbobenzoksy — feniloalaninoglicyny o temperaturze topnienia 104,5—107,5°C. (Temperatura topnienia związku według danych literaturowych 109°C).

Przykład III. 356 mg (1mM) karbobenzoksy-glicylo-feniloalaniny rozpuszcza się w 2 ml octanu etylu, dodaje się 105 mg (1,1 mM) 3-hydroksypirydyny, chłodzi do temperatury 0°C, i dodaje 206 mg (1mM) dwucykloheksylokarbodwuimidu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w ciągu pół godziny w temperaturze 0°C, 17 godzin w temperaturze pokojowej i przerabia jak w przykładzie I. Otrzymuje się 95% estru w postaci oleju.

Analiza związku o wzorze $C_{24}H_{22}O_5N_2$

N obliczono 9,66%
N znaleziono 9,30%
9,55%

207 mg (0,5 mM) estru 3-pirydylowego karbobenzoksy-glicylofeniloalaniny rozpuszcza się w 1 ml octanu etylu, dodaje 76 mg (0,55 mM) chlorowodorku estru etylowego glicyny i 0,077 ml (0,55 mM) trójetiloaminy oraz 34 mg (0,5 mM) pirazolu.

Po 20 godzinach reakcji w temperaturze pokojowej mieszaninę poreakcyjną przemywa się wodą, 1 n kwasem solnym, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu i wodą. Po wysuszeniu za pomocą siarczany magnezu, octan etylu odparowuje się, a pozostałość krystalizuje z mieszaniny octan etylu/petrol. Otrzymuje się 166 mg trójetiloaminy o temperaturze topnienia 130,5°C (temperatura topnienia związku według danych literaturowych 132—134°C.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania estrów N-chronionych peptydów poprzez estry aktywne N-chronionych aminokwasów lub peptydów, **znamienny tym, że** N-chronione aminokwasy lub peptydy przeprowadza się w estry pirydylowe przez aktywowanie ich grupy karboksylowej np. za pomocą dwucykloheksylokarbodwuimidu lub przez przeprowadzenie ich grupy karboksylowej w bezwodniki mieszane i następne sprzęganie z hydroksypirydyną w środowisku rozpuszczalnika organicznego, po czym otrzymane estry pirydylowe N-chronionych aminokwasów lub peptydów poddaje się w środowisku rozpuszczalnika organicznego lub organiczno-wodnego reakcji z solami lub estrami aminokwasów lub peptydów, ewentualnie w obecności katalizatorów przyspieszających aminolizę, a otrzymany produkt po przemyciu poddaje krystalizacji.