

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

145 455

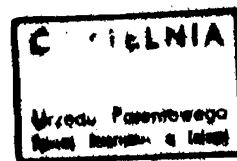
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 84 10 16 (P. 258 604)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 87 03 23

Opis patentowy opublikowano: 89.05.31



Int. Cl.⁴ C07K 5/02

Twórcy wynalazku: Ryszard Andruszkiewicz, Henryk Chmara, Sławomir Milewski,
Edward Borowski

Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska, Gdańsk (Polska)

SPOSÓB OTRZYMYWANIA

NOWYCH POCHODNYCH KWASU L-2,3-DIAMINOPROPANOWEGO O STRUKTURZE DIPEPTYDÓW

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych pochodnych kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów o wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R jest resztą alaniny, metioniny, waliny, norwaliny, leucyny, norleucyny, kwasu α -aminomasłowego lub fenyloalaniny. Dotychczas z J. Antibiot 25, 137 - 140, 1972 - B.B. Molloy et al znany jest antybiotyk o symbolu kodowym A 19009, będący N³-fumaranoilo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-alaniną, otrzymywany na drodze fermentacji. Antybiotyk ten wykazuje słabą aktywność biologiczną w stosunku do niektórych grzybów, natomiast nieznana jest jego aktywność przeciwko grzybowi z rodzaju Candida. Pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów są dotychczas nieznanne.

Sposób otrzymywania nowych pochodnych kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, w którym R ma podane wyżej znaczenie, według wynalazku charakteryzuje się tym, że monoester metylowy kwasu fumarowego aktywuje się i poddaje reakcji z solą sodową kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego w środowisku polarnego rozpuszczalnika organicznego lub jego mieszaniny z wodą, uzyskany kwas N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowy przeprowadza się w ester aktywny, którym acyluje się aminokwas jednoaminojednokarboksylowy, zaś po upływie 10 ÷ 12 godzin uzyskany N-chroniony dipeptyd wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej, usuwa ochronę grupy aminowej, a produkt końcowy w postaci soli izoluje np. przez krystalizację i ewentualnie przeprowadza w wolny kwas.

Czynnikiem aktywującym monoester alkilowy kwasu fumarowego i kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowy jest N-hydroksysukcynimid. Jako polarny rozpuszczalnik organiczny stosuje się tetrahydrofuran lub mieszaninę jednowodorotlenowego alkoholu alifatycznego o długości łańcucha C1 ÷ C5 z wodą. Tożsamość uzyskanych pochodnych stwierdzono przy pomocy spektrometrii masowej, analizy elementarnej i spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego. Wartość jonów masowych określono przy pomocy spektrometrii masowej techniką

desorpcji polem - field desorption. Przedmiotowe pochodne wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, w tym nieoczekiwanie wysoką aktywność przeciwgrzybową wobec *Candida albicans*. Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej wykonano metodą rozcieńczeń seryjnych w podłożu płynnym YNB (Yeast Nitrogen Base), zawierającym 2% flukozy, w temperaturze 30°C, czas odczytu 48 godzin.

Zaletą wynalazku jest możliwość otrzymania nietoksycznych lub mało toksycznych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Uzyskane pochodne oprócz aktywności przeciwbakteryjnej wykazują zwłaszcza aktywność przeciwgrzybową, a ich działanie polega na specyficznej inhibicji syntezy glukozy, co prowadzi do zahamowania biosyntezy ściany komórkowej drobnoustroju. Brak aktywności inhibicyjnej w uzyskanych przez nas związkach w stosunku do innych enzymów wpływa na to, że przedmiotowe pochodne nie są toksyczne dla organizmów zwierzęcych. Ponadto, związki przeciwgrzybowe działające w oparciu o inne mechanizmy są toksyczne z np. związki błonowoczynne, makrolidy polienowe, inhibitory syntezy chitynowej - np. antybiotyk polioksyna, inhibitory biosyntezy steroli - np. pochodne imidarolu jak ketoconazole. Poza tym, znane związki działające na syntezę glukozyaminową lecz niespecyficzne, działające również na inne enzymy - np. azoseryna, DON itp. są silnie toksyczne. Pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów oraz sposoby ich otrzymywania ilustrują podane niżej przykłady.

P r z y k ł a d I. 6.12 g (30 mM) kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego rozpuszcza się w mieszaninie 80 ml wody i 20 ml metanolu oraz dodaje 2,52 g (30 mM) kwaśnego węgla sodu. Mieszaninę schładza się do 0°C i przy silnym mieszaniu dodaje 6.81 g (30 mM) estru N-hydroksysukcynimidowo-metylowego kwasu fumarowego. Reakcję prowadzi się przez 4 godziny, a po tym czasie metanol odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość zalewana 1 N kwasem solnym do pH=2. Uzyskany produkt kilkakrotnie ekstrahuje się octanem etylu, warstwę organiczną przemycia 30% roztworem chlorku sodu, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu, odparowuje rozpuszczalnik i krystalizuje z mieszaniny octanu z heksanem. Uzyskuje się 7.2 g kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o tt. 72 - 74°C, co stanowi 76% wydajności teoretycznej. 3.16 g (10mM) kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego i 1.15 g (10mM) N-hydroksysukcynimidu rozpuszcza się w 50 ml tetrahydrofuranu, chłodzi do 0°C i dodaje 2.25 g (11 mM) dicykloheksylokarbodiimidu w 20 ml tetrahydrofuranu. Reakcję prowadzi się przez 1 godzinę w temperaturze 0°C, a następnie przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odsąca się dicykloheksylomocznik, zaś filtrat odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 3.92 g estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego, co stanowi 95% wydajności teoretycznej. Do schłodzonego roztworu 0.74 g (5 mM) L-metioniny i 0.42 g (5 mM) kwaśnego węgla sodu w 10 ml wody dodaje się przy silnym mieszaniu 2.065 g (5 mM) estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego w 10 ml tetrahydrofuranu i pozostawia na 10 godzin. Następnie odparowuje się rozpuszczalnik, pozostałość rozpuszcza się w 10 ml wody i zakwasza 1 N kwasem solnym do pH = 2, a produkt reakcji kilkakrotnie ekstrahuje octanem etylu. Warstwę organiczną przemycia się wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje. Pozostałość krystalizuje się z octanu etylu i heksanu. Otrzymuje się 1.96 g N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo L-2,3-diaminopropanoilo-L-metioniny, co stanowi 99% wydajności teoretycznej. 8.89 g (2 mM) N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-metioniny rozpuszcza się w 20 ml 2N chlorowodoru w dioksanie i pozostawia na 3 godziny w temperaturze pokojowej, do utworzenia chlorowodoru N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-metioniny. Następnie odparowuje się chlorowódor i dioksan, pozostałość krystalizuje się z mieszaniny metanolu i eteru etylowego. Otrzymuje się 0.55 g chlorowodoru N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-metioniny o tt. 170 - 172°C, co stanowi 82% wydajności teoretycznej. MIC = 3,2 µg/ml.

P r z y k ł a d II - VII. Analogicznie jak w przykładzie I otrzymano następujące pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów, przedstawione w poniższej tabeli:

T a b e l a 1

Przykład	Nazwa pochodnej	Otrzym. zgodnie z przykł.	Temperatura topnienia
II	N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-walina	I	172 - 174°C
III	N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-norwalina	I	189 - 190°C
IV	N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-leucyna	I	175 - 178°C
V	N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-norleucyna	I	178 - 180°C
VI	kwas N-/N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-2-aminobutanowy	I	180 - 182°C
VII	kwas N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-fenylalaniny	I	183 - 185°C

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Sposób otrzymywania nowych pochodnych kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, w którym R jest resztą alaniny, metioniny, waliny, norwaliny, leucyny, norleucyny, kwasu α-aminomasłowego lub fenylalaniny, z n a m i e n n y t y m, że monoester metylowy kwasu fumarowego aktywuje się N-hydroksysukcynoimidem i poddaje reakcji z solą sodową kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowym w środowisku tetrahydrofuranu lub mieszaniny jednowodorotlenowego alkoholu alifatycznego o długości łańcucha C1 ÷ C5 z wodą i uzyskany kwas N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowy aktywuje się N-hydroksysukcynoimidem i acyluje nim aminokwas jednoaminojednokarboksylowy, zaś po upływie 10 ÷ 12 godzin uzyskany N-chroniony dipeptyd wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej, usuwa ochronę grupy aminowej, a produkt końcowy w postaci soli izoluje korzystnie przez krystalizację i ewentualnie przeprowadza w wolny kwas.

