



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 197 162

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 08 78
(21) PV 5465-78

(11) (B 1)

(51) Int. Cl.³ C 07 C 103/40

(40) Zveřejněno 31 07 79
(45) Vydáno 15 08 83

(75)

Autor vynálezu RYCHLÍK IVAN MUDr. DrSc., JANDA MIROSLAV doc. ing. CSc.,
DVOŘÁK DALIMIL ing., VALENTA MIROSLAV ing. CSc., FÁBRY MILAN RNDr.,
ČERNÁ JIŘINA ing. DrSc. a KALVODA LADISLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Hydrochloridy esterů aminokyselin s chloramfenikolem a způsob jejich přípravy

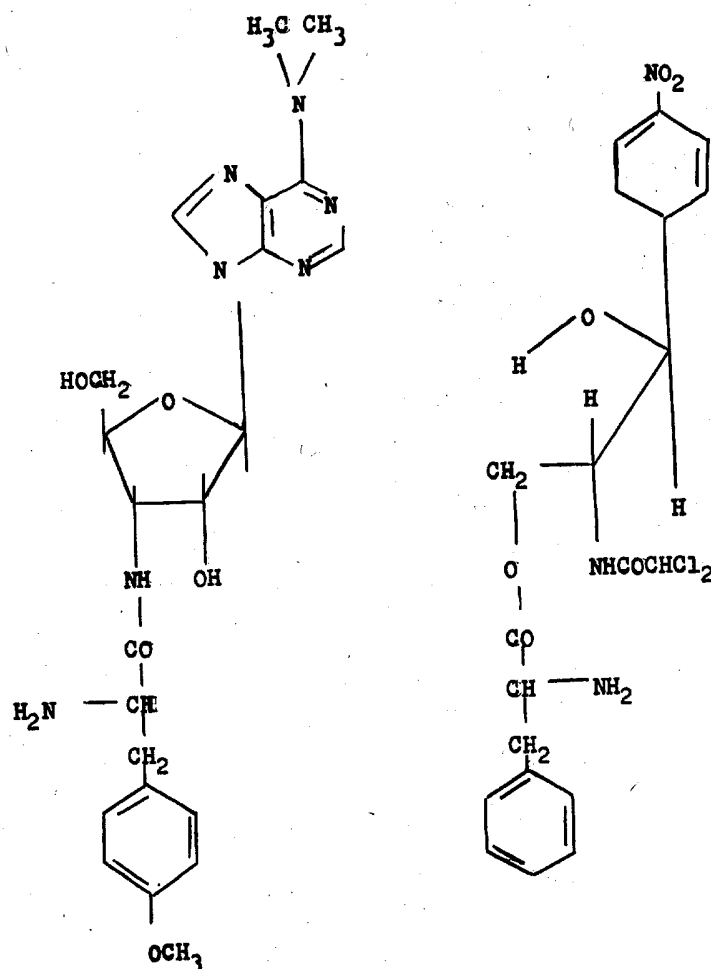
1

Vynález se týká hydrochloridů esterů aminokyselin s chloramfenikolem a způsobu jejich přípravy.

Antibiotikum chloramfenikol je stále předmětem výzkumu z hlediska mechanismu jeho působení. Je známo, že podstata účinku tohoto antibiotika je inhibice transpeptidace v buňce mikroorganismu.

Zvláště účinným inhibitorem proteosyntézy je antibiotikum puromycin, který je chemicky analogem aminoacyladenosinu. Při studiu vlivu chloramfenikolu na tvorbu acetyl-fenylalanylpuromycinu bylo zjištěno, že chloramfenikol působí jako kompetitivní inhibitor puromycinu.

Vhodný derivát chloramfenikolu nesoucí ve vhodné konfiguraci volnou aminoskupinu a připomínající co nejvěrněji koncové uspořádání aminoacyladenosinu (resp. aminoacylcytosinu) by mohl být účinným akceptorem v peptidyltransferázové reakci. Vycházejíce z těchto strukturních předpokladů, bylo možno se přiblížit struktuře aminoacyladenosinu, resp. aminoacylcytosinu vázáním vhodné volené aminokyseliny. Proto byly připraveny estery chloramfenikolu s aminokyselinami obou sterických representací (tedy D- i L-).

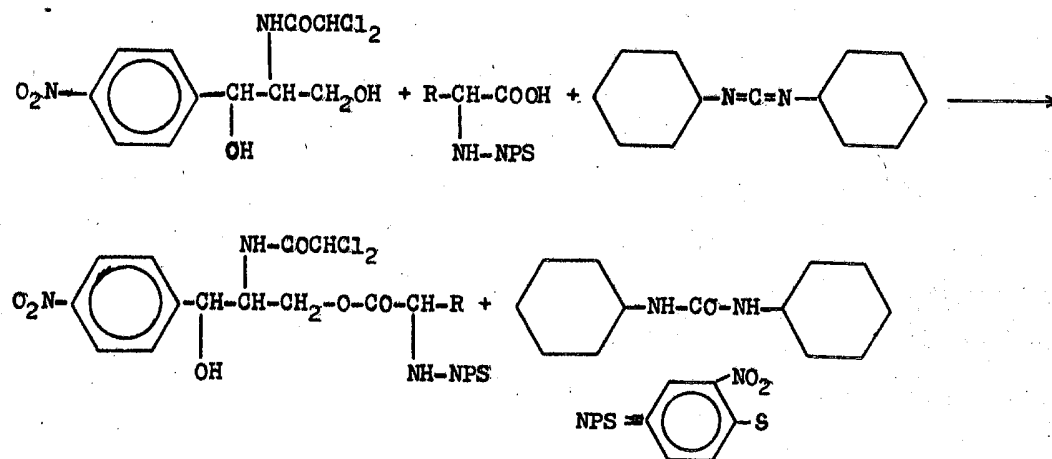


Jak ukazuje výkres, je podoba struktury největší u erythroisomerů chloramfenikolu. Proto byly připraveny estery nejen D-threo-chloramfenikolu, ale i farmakologicky nedělných L-threo a racemického erythro isomeru.

Bylo připraveno čtrnáct esterů aminokyselin s chloramfenikolem, u kterých byla zkoumána akceptorová aktivita v systému, který obsahoval 70 S ribosomy a N-acetyl-L-leucinylnhexanukleotid s 14 C označeným leucinem jako donor. Akceptorová aktivita byla srovnána s aktivitou puromycinu ve stejném systému. Byla zjištěna významná aktivita u esterů D, L-erythro-chloramfenikolu, přičemž není velký rozdíl mezi estery D- a L-aminokyselin, jak ukazuje tabulka:

ester D,L-chloramfenikolu	akceptorová aktivita ve srovnání s puromycinem (%)
L-leucinát	57
L-fenylalanát	30
L-O'-methyl-thyrosinát	45
D-valinát	65

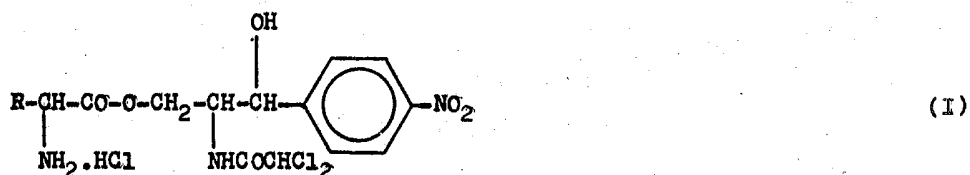
Problém dále spočíval v nalezení vhodné metody pro esterifikaci chloramfenikolu aminokyselinami. V chemii chloramfenikolu je popsáno několik příprav analogického typu, jako je glycinát, sukcinát, palmitát, kdy se působí chloridem příslušné kyseliny na chloramfenikol za současného přidavku alkálie k neutralisaci odštěpujícího se chlorovodíku. V případě aminokyselin se však tato metoda neuplatnila vzhledem k malé stálosti použitých chloridů aminokyselin s chráněnou aminoskupinou. Bez úspěchu byla i metoda využívající kondenzace aminokyseliny s chloramfenikolem za přítomnosti N, N-dimethylformamid-dineopentylacetalu. Úspěchu bylo dosaženo pomocí dicyklohexylkarbodiimidu (DCCI), kdy probíhá reakce aminokyseliny s chráněnou aminoskupinou s chloramfenikolem v prostředí pyridinu podle rovnice:



Esterifikace probíhá na primární alkoholické skupině chloramfenikolu, jak bylo dokázáno z výsledků elementární analýzy.

K odstranění běžně používané benzyloxykarbonylové chránící skupiny nebylo možno použít běžné hydrogenační metody vzhledem k přítomnosti nitroskupiny a dichloracetylového zbytku. Rovněž při použití bromovodíku v kyselině octové, resp. trifluoroctové, což jsou činidla, kterých se k tomuto účelu užívá, dochází k destrukci molekuly. Proto byla k chránění volné aminoskupiny v aminokyselinách zvolena o-nitrosulfonylová skupina, kterou je možno odstranit za velmi mírných podmínek. Reakcí takto chráněných aminokyselin s chloramfenikolem v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu se podařilo získat řadu esterů.

Vynález se tedy týká hydrochloridů esterů aminokyselin s chloramfenikolem obecného vzorce I, kde R značí skupinu



isopropyllovou, 2-methylpropyllovou, benzylovou a 4-methoxybenzylovou.

Dále se vynález týká způsobu přípravy hydrochloridů esterů aminokyselin s chloramfenikolem. Jeho podstata spočívá v tom, že se na aminokyseliny s chráněnou aminoskupinou obecného vzorce II,



kde R_1 značí O'-nitro-sulfenylovou skupinu a chloramfenikol působí dicyklohexylkarbodiimidem za přítomnosti rozpouštědla, s výhodou pyrimidinu, za teploty od 0 do 50 °C, načež ze vzniklého meziproductu odstraní kyselou hydrolyzou působením chlorovodíku v éteru při teplotě -10 až 35 °C chránící o-nitrosulfenylová skupina.

Podle dalších význaků vynálezu se jako aminokyseliny používají L-leucin, L-fenylalanin, D-fenylalanin, L-methylthirosin, D-valin a jako chloramfenikol D-threo-chloramfenikol, L-threo-chloramfenikol a D, L-erythro-chloramfenikol v různých kombinacích.

Podle vynálezu tedy byl připraven nový typ akceptorového substrátu, který nebyl dosud popsán a který vykazuje výraznou akceptorovou aktivitu. Látka podle vynálezu zasahuje účinně do proteosyntézy mikroorganismů, a má předpoklady účinného farmakologického využití, zvláště vzhledem k využití L-threo a L-erythroisomeru.

Látka podle vynálezu a způsob její přípravy je dále blíže popsán na několika příkladech provedení.

Příklad 1

3 mmol dicyklohexylamonné soli aminokyseliny byly jemně rozetřeny a roztřepány v děliče v 75 ml ethylacetátu. Potom bylo přidáno 20 ml 0,2 N kyseliny sírové a směs byla intenzivně protřepána. Přitom se suspenze rozpustí. Vodná vrstva byla vylita, organická promyta 50 ml vody a sušena bezvodým síranem sodným. Po odsátí sušidla byl ethylacetát za vakua odpařen. Po ochlazení olejovitý zbytek obvykle zkrystaloval. K takto připravené N-NPS aminokyselině byly přidány 3 mmol chloramfenikolu a 3,2 mmol dicyklohexylkarbodiimidu. Látky byly rozpuštěny v 30 ml suchého pyridinu. Takto připravený roztok byl ponechán 20 hodin při teplotě místnosti. Vyloučená dicyklohexylmočovina byla odsáta a promyta chloroformem. Ze spojených filtrátů bylo odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce při 50 °C. Z odparku byly odstraněny zbytky pyridinu několikanásobným odpařením s xylenem. Odparek byl zpracován preparativní chromatografií na tenké vrstvě. Frakce o R_F asi 0,5 byla vymyta do éteru. Eterický roztok byl vysušen síranem sodným a odpařen do sucha. Odparek byl přelit 20 ml suchého éteru. Přitom se vyloučila bílá krystalická látka, zatímco žlutý ester N-NPS-aminokyseliny s chloramfenikolem přešel do roztoku. Krystalická bílá látka byla odsáta a promyta 5 ml suchého éteru. Ke spojeným eterickým roztokům byly přidány 3 ml 2 N chlorovodíku v bezvodém éteru. Po 3 až 4 minutách byla sraženina chloridu esteru aminokyseliny s chloramfenikolem odsáta a promývána suchým éterem, dokud nebyl filtrát bezbarvý. Takto získaný ester byl sušen za vakua. Všechny operace po přidání roztoku chlorovodíku byly provádě-

skry s vyloučením vzdušné vlhkosti.

Příklad 2

Z 2,80 g dicyklohexylamonné soli N-nitrosulfenyl-L-leucinu a 1,00 g L-threo-chloramfenikolu bylo analogicky podle příkladu 1 získáno 0,75 g hydrochloridu L-leucinátu L-threo-chloramfenikolu, t.t. 92 až 97 °C.

Příklad 3

Z 2,80 g dicyklohexylamonné soli N-NPS-L-leucinu a 1,00 g D-threo-chloramfenikolu bylo analogicky podle příkladu 1 získáno 0,65 g hydrochloridu L-leucinátu D-threo-chloramfenikolu, t.t. 114 až 118 °C.

Příklad 4

Analogicky podle příkladu 1 bylo z 2 g L-threo-chloramfenikolu a 1,5 g dicyklohexylamonné soli N-NPS-L-fenylalaninu a 0,70 g DCCI získáno 0,65 g L-fenylalanátu L-threo-chloramfenikolu, t.t. 95 až 100 °C.

Příklad 5

Analogicky podle příkladu 1 bylo z 1,05 g dicyklohexylamonné soli N-NPS O-methylthirosinu, 0,65 g chloramfenikolu a 0,70 g DCCI získáno 0,45 g L-O'-methylthirosinátu D-threo-chloramfenikolu, t.t. 165 až 172 °C.

Příklad 6

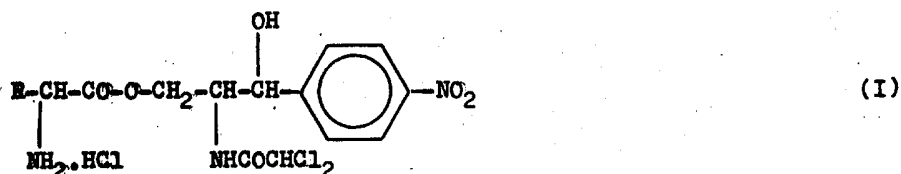
Analogicky podle postupu v bodu 1 bylo z 0,5 g dicyklohexylamonné soli N-NPS-D-valinu, 0,40 g L-chloramfenikolu a 0,40 g DCCI získáno 0,30 g hydrochloridu D-valinátu D-chloramfenikolu t.t. 104 až 111 °C.

Příklad 7

Analogicky podle postupu v bodu 1 a navážek v bodu 6, získáno 0,20 g hydrochloridu D-valinátu L-chloramfenikolu, t.t. 168 až 175 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Hydrochloridy esterů aminokyselin s chloramfenikolem obecného vzorce I,



kde R značí skupinu isopropylovou, 2-methylpropylovou, benzylovou a 4-methoxybenzylovou.

2. Způsob přípravy hydrochloridů esterů aminokyselin s chloramfenikolem obecného vzorce I, vyznačený tím, že se na aminokyselinu s chráněnou aminoskupinou obecného vzorce (II),



(II)



kde R_1 značí o-nitro-sulfenylovou skupinu, a chloramfenikol působí dicyklohexylkarbodiimidem za přítomnosti rozpouštědla, a výhodem pyrimidinu za teploty od 0 do 90 °C, načež se se vzniklého meziprojektu odstraní kyselinou hydrolyzou působením chlorovodíku v éteru při teplotě -10 až 35 °C chránící o-nitro-sulfenylová skupina.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že se jako aminokyselina používá L-leucin jako chloramfenikol D-threo-chloramfenikol.
4. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že se jako chloramfenikol používá L-threo-chloramfenikol.
5. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že se jako aminokyselina používá L-fenylalanin.
6. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že se jako aminokyselina používá D-fenylalanin.
7. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že se jako aminokyselina používá L-o-methyl-thyrosin.
8. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že se jako aminokyselina používá D-valin.
9. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že se jako chloramfenikol používá D,L-erythro-chloramfenikol.