



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

201034

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 C 101/04

(22) Přihlášeno 16 07 76
(21) (PV 3519-75)
(32)(31)(33) Právo přednosti
od 22 07 75 (30632/75)
Velká Británie
(40) Zveřejněno 31 01 80
(45) Vydáno 15 01 84

(72) Autor vynálezu
(73) Majitel patentu

UMEZAWA HAMAŌ, TOKIO, AOYAGI TAKAĀKI, KANAGAWA-KEN, TAKITA TOMOHISA,
SAITAMA-KEN, NISHIZAWA RINZO a SAINO TETSUSHI, TOKIO (JAPONSKO)
ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI, TOKIO (JAPONSKO)

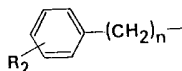
(54) Způsob výroby aminokyselin

1

Vynález se týká způsobu přípravy nové aminokyseliny obecného vzorce I

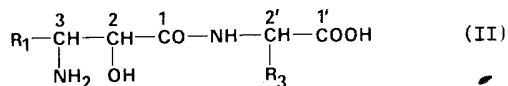


kde R_1 je alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, cyklopentylmethyl, cyklohexylmethyl, cykloheptylmethyl nebo skupina vzorce



kde R_2 je atom vodíku, chloru, methyl, nitroskupina, hydroxyl nebo aminoskupina a n je 0 nebo 1.

Tyto sloučeniny jsou použitelné jako výchozí sloučeniny pro přípravu sloučenin inhibujících aminopeptidasu B, leucinaminopeptidasu a bleomycin-hydrolasu, zvyšujících protinádorovou účinnost bleomycinu a majících protiploštní účinnost, obecného vzorce II



kde R_1 a R_2 mají význam uvedený výše, a

R_3 je substituent vybraný ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkyl s 1 až 2 atomy uhlíku, alkoxyethyl s 2 až 3 atomy uhlíku, alkylthiomethyl s 2 až 3 atomy uhlíku, karboxamidoalkyl s 1 až 2 atomy uhlíku a karboxyalkyl s 2 až 3 atomy uhlíku.

Ze sloučenin obecného vzorce II, se (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucin nazývá bestatin, a může se připravit ze živného média houby, produkující bestatin náležející k aktinomycetům. Tato nová sloučenina má výše uvedenou fyziologickou účinnost.

201034

Aminokyselina nebo její deriváty obecného vzorce I se může připravit kyselou hydrolýzou derivátů nitrilu obecného vzorce III



kde R_1 má význam uvedený výše nebo derivátů nitrilu s chráněnou aminoskupinou.

Jako typické příklady derivátů nitrilů obecného vzorce III lze jmenovat nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxypropionové, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanové, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-3-fenylpropionové, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylmásečné, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylmásečné, nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-4-p-methylfenylmásečné, nitril kyseliny p-methoxyfenylmásečné, nitril kyseliny p-hydroxyfenylmásečné a nitril kyseliny 3-amino-2-hydroxy-4-p-benzyloxyfenylmásečné.

Pro chránění aminoskupiny se může použít kterákoli skupina pro chránění aminoskupiny, jak jsou známy z chemie peptidů.

Jako výhodné příklady acylových skupin ke chránění aminoskupiny je možno uvést skupiny formylovou, acetylovou, trifluoracetylovou, benzoylovou skupinu, popřípadě substituovanou; jako příklady chránicích skupin urethanového typu pro aminoskupiny je možno uvést případně substituovanou benzyloxykarbonylovou skupinu, alkoxykarbonylovou skupinu s 2 až 7 atomy uhlíku, a cykloalkoxykarbonylovou skupinu.

Jako výhodné příklady dalších chránicích skupin, použitelných pro chránění aminoskupiny, je možné uvést arylsulfonylové skupiny, případně substituované, ftalylovou skupinu, o-nitrofenylsulfonylovou skupinu nebo tritylovou skupinu.

Při provádění hydrolýzy podle vynálezu se může použít kterákoli z kyselin, které se obvykle používají při hydrolýze nitrilů. Jako příklady anorganických kyselin přicházejí v úvahu kyselina chlorovodíková, bromovodíková nebo sírová, jako příklady organických kyselin lze uvést alkylsulfonové kyseliny, jako kyselina methansulfonová, ethansulfonová, dále arylsulfonové kyseliny, jako je kyselina benzensulfonová a toluensulfonová.

Koncentrace těchto kyselin se může pohybovat v jakémkoliv rozmezí, pokud je vhodné pro hydrolýzu obvyklých nitrilů. Ale koncentrace nad 1 N je možno označit vždy za výhodné.

V případě sloučenin s chráněnou aminoskupinou, které se špatně rozpouštějí ve vodných roztocích kyselin, je možno přidat organické rozpouštědlo, mísitelné s vodou, jako je tetrahydrofuran, dioxan, nižší alkoholy, aceton, dimethylformamid, dimethylacetamid a dimethylsulfoxid. Zvýší se tím rozpustnost sloučenin ve vodných suspenzích.

V případě použití chránicí skupiny, pak odstraňuje-li se tato chránicí skupina hydrolýzou za vzniku elektrofilních látek, přidává se látka vázající kationty, jako je anisol.

Teplota při hydrolýze se může pohybovat v jakémkoliv rozmezí od teploty místnosti až do teploty varu reakční směsi pod zpětným chladičem. Při izolaci očekávané aminokyseliny z reakční směsi se může použít kterýkoli z obvyklých postupů pro takovou izolaci.

Například, provádí-li se hydrolýza působením těkavé kyseliny, pak se nadbytek použité kyseliny může odstranit zahuštěním reakční směsi za sníženého tlaku, a potom se zbytek rozpustí ve vodě a roztok se neutralizuje vodným roztokem báze až do dosažení isoelektrického bodu.

Dále se do reakční směsi přidá, je-li to žádoucí, aceton, methanol nebo ethanol, tím vykristaluje sloučenina obecného vzorce I, která se potom odfiltruje. Nebo v jiném případě při použití netěkavé kyseliny se reakční směs zředí vodou tak, že je méně než 1 N na kyseli-

nu a roztok se prolije iontoměničovou pryskyřicí silně kyselé povahy, tak, že se na iontoměničové pryskyřici adsorbuje požadovaná aminokyselina. Ta se potom eluuje z iontoměničové pryskyřice těkavou bází, jako je amoniak, zředěný vodou a roztok se zahustí za sníženého tlaku. Je-li to třeba, přidává se aceton, methanol nebo ethanol, čímž se napomáhá krystalizaci produktu, tj. sloučeniny obecného vzorce I, která se potom odfiltruje.

Při právě uvedené reakci se získá za použití derivátu (R)-nitrilu jako výchozí sloučeniny (2RS, 3R)-aminokyselina; použije-li se (S)-nitril, získá se (2RS, 3S)-aminokyselina. Při použití derivátu (RS)-nitrilu se takto získá (2RS, 3RS)-aminokyselina.

Získané sloučeniny obecného vzorce I se mohou použít v surovém stavu jako výchozí látky při dále uvedeném postupu. Tak například kyselina 3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová, která je výchozí látkou pro přípravu bestatinu, je ve formě (2S, 3R). Takže se zřetelem na získání této sloučeniny je třeba štěpit kyselinu (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanovou na složku (2S, 3R)- a (2R, 3R)-.

Kyselina (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová se rozdělí na optické isomery v ethylesteru kyseliny octové tak, že se diastereoisomer, který se získá nejprve benzyloxykarbonylací (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny převede na kyselinu benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanovou a z této látky se potom připraví sůl brucinu.

Přesněji řečeno se za zahřívání v ethylesteru kyseliny octové rozpustí kyselina benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová a odpovídající ekvivalent brucinu, případně malý nadbytek této látky, a roztok se filtruje, pokud je to třeba.

Při chlazení nebo chlazení filtrátu se vyloučí krystaly, které se odfiltrují a pokud je to třeba, opakuje se překrystalování z ethylesteru kyseliny octové, až se získá opticky čistá sůl brucinu s kyselinou benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanovou. Obvyklým zpracováním této soli brucinu se dále získá opticky čistá kyselina benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová.

Jinak se může čistá kyselina benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová připravovat takto:

Roztok soli brucinu a kyseliny benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové v ethylesteru kyseliny octové, obsahující malé množství kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové se zbaví brucinu protřepáváním se zředěným roztokem chlorovodíkové kyseliny, potom se vrstva ethylesteru kyseliny octové vysuší dehydratačním činidlem, jako je bezvodý síran sodný, a filtrát se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v malém množství ethylesteru kyseliny octové. Přidáním petroletheru se vyloučí krystalky a filtrací tohoto podílu se získá čistá kyselina benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová.

Bylo zjištěno, že (2R, 3R)-forma kyseliny benzyloxykarbonyl-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové je méně rozpustná v organických rozpouštědlech než odpovídající (2S, 3R)-forma.

Kyselina benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová se rozpustí nejprve v rozpouštědle za teploty místnosti nebo za zahřívání a přidáním dalšího rozpouštědla, které rozpouštěnou látku nerozpouští, se vysrážejí krystaly, které je možno oddělit filtrací. A je-li to třeba, pak se tento postup opakuje, až se tím získá opticky čistá kyselina benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová.

Jako prvé rozpouštědlo, ve kterém se zmíněná látka rozpouští, se může použít některý z nižších alkoholů, jako je methanol, ethanol a propanol, dále některý z etherů, jako je diethylether, diisopropylether, tetrahydrofuran a dioxan, posléze látky ze skupiny esterů,

jako je methylester nebo ethylester kyseliny octové, ketonů, jako je aceton a methylethylketon, halogenovaných derivátů uhlovodíků, jako je methylenchlorid a chloroform, amidů, jako je dimethylformamid a dimethylacetamid a konečně některý z nitrilů, jako je například acetonitril.

Jako druhé rozpouštědlo, kterým se prvé ředí za vysrážení produktu, lze uvést uhlovodíkové frakce z ropy, jako je petrolether, benzin a ligroin, dále aromatické uhlovodíky, jako je benzen a toluen, alkyany jako je pentan a hexan, dále cykloalkany, jako je cyklopentan a cyklohexan. Za použití postupu s diastereoisomery a brucinem je možno získat z filtrátu nečistou kyselinu benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanovou, a čištěním je možno z této látky získat opticky čistou kyselinu (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanovou.

Kyselina benzyloxykarbonyl-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová, která se používá při výše uvedeném štěpení na optické antipody, se může syntetizovat za použití postupu podle Schottena a Baumanna reakcí kyseliny (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové s benzyloxykarbonylchloridem za přítomnosti báze, nebo za přítomnosti terciárního aminu, jako je triethylamin nebo N-methylmorpholin, a v tom případě se použije jako benzyloxykarbonylační činidlo benzyloxykarbonylační činidlo benzyloxykarbonyl-p-nitrofenylester, benzyloxykarbonylazid, benzyloxykarbonyl-N-hydroxysukcinimidester a benzyl-S-karbonyl-4,6-dimethyl-2-merkaptopyrimidin v rozpouštědle, jímž je směs dioxanu, tetrahydrofuranu, acetonitrilu nebo dimethylformamidu s vodou.

Ačkoliv výše uvedené štěpení na optické antipody je popsáno s přihlédnutím ke kyselině 3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové, může se podobný postup popřípadě použít pro další aminokyseliny.

Dále je uveden postup pro přípravu bestatinu a příbuzných sloučenin vzorce II za použití sloučenin vzorce I podle vynálezu.

Aminokyselina obecného vzorce II se kondenzuje se sloučeninou obecného vzorce IV



kde R_3 má význam uvedený výše za použití postupu, který se obvykle používá k řazení aminokyselin v chemii peptidů, a potom se odstraní chránicí skupiny, kterých bylo případně použito - je-li to nutno - ke chránění funkčních skupin, které neměly účast na vlastní reakci.

Jako typické příklady aminokyselin je možno uvést glycin, alanin, kyselinu 2-aminobutanovou, valin, norvalin, leucin, norleucin, isoleucin, terc.-leucin, kyselinu 2-aminoheptanovou, kyselinu 2-amino-5-methylhexanovou, kyselinu 2-aminooktanovou, kyselinu 2-amino-6-methylheptanovou, serin, threonin, allothreonin, cystein, homocystein, asparagin, glutamin, O-methylserin, O-ethylserin, O-propylserin, methionin, ethionin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, fenylglycin, p-methoxyfenylglycin, fenylalanin, tyrosin, p-methoxyfenylalanin a p-nitrofenylalanin.

Mezi způsoby kondenzace aminokyseliny obecného vzorce I s aminokyselinou obecného vzorce IV patří karbodiimidový postup za použití buď dicyklohexylkarbodiimidu nebo 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu. Dále se může použít azidového postupu za použití kyseliny dusité nebo jejího alkylesteru, postup smíšených anhydridů za použití ethylesteru kyseliny chlormravenčí nebo isobutylesteru kyseliny chlormravenčí, způsob za použití aktivních esterů, jako je kyanmethylester, vinylster, fenylester, popřípadě substituovaný, thiofenylester nebo N-hydroxysukcinimidoester, dále postup s O-acylhydroxylaminoderivátem, jako je O-acylacetoxim nebo O-acylcyklohexanonoxim, a postup s N-acylderiváty za použití karbonyldiimidazolů.

Z organických rozpouštědel použitelných při výše uvedené kondenzační reakci je možno jmenovat ethery, jako je diethylether, tetrahydrofuran nebo dioxan, estery, jako je ethylester nebo methylester kyseliny octové, dále ketony, jako je aceton nebo methylethylketon,

halogenované deriváty uhlovodíků, jako je methylenchlorid nebo chloroform, amidy, jako je dimethylformamid nebo dimethylacetamid a nitrily, jako je acetonitril.

V případě kondenzace aminokyseliny obecného vzorce I s chráněnou aminoskupinou a aminokyselinou obecného vzorce IV s nechráněnou karboxylovou skupinou a za použití postupů aktivních esterů se může jako rozpouštědlo použít směs vody a rozpouštědla mísitelného s vodou za přítomnosti organické báze, jako je hydrogenuhličitán sodný nebo oxid hořečnatý, nebo za přítomnosti organického terciárního aminu, jako je triethylamin nebo N-methylmorpholin.

Ze vzniklého produktu se mohou odstranit případné chránicí skupiny použitím postupů, obvyklých v chemii peptidů, jako je katalytická hydrogenace na paládium, zmýdelnění v alkalickém prostředí, acidolýza působením bromovodíku v kyselině octové, reakce s kyselinou trifluoroctovou, s chlorovodíkem v dioxanu, tetrahydrofuranu nebo ethylesteru kyseliny octové, reakce s kapalným fluorovodíkem, hydrazinolýza působením hydrazinu nebo reakcí se sodíkem v kapalném amoniaku. Získá se tím očekávaná sloučenina obecného vzorce II.

Derivát nitrilu obecného vzorce III, který se používá při postupu podle vynálezu jako výchozí látka, se může syntetizovat redukcí alfa-aminokyseliny, jejíž aminoskupina je chráněna a karboxylová skupina převedena do funkce amidové skupiny, a to reakcí se sekundárním aminem za teploty pod 0 °C a hydridem kovu v etheru, jako je diethylether nebo tetrahydrofuran; vzniká aminoaldehyd s chráněnou aminoskupinou. Ten se převede na adukt s hydrogensířičitanem sodným, a potom se provede další reakce s kyanidem alkalického kovu nebo přímo s kyanovodíkem za vzniku kyanhydridu nebo 3-amino-2-hydroxynitrilu.

Jako příklady výhodných sekundárních aminů je možno uvést N,N-dimethylamin, aziridin, N-methylenilin, karbazol, 3,5-dimethylpyrazol a imidazol. Jako příklady výhodných hydridů kovů lze jmenovat hydrid hlinitolitný, lithiumdialkoxyaluminiumhydrid, lithiumtrialkoxyaluminiumhydrid a natrium-bis-(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid.

Jako příklad chránicí skupiny pro aminoskupinu je možno uvést kteroukoli z chránicích skupin, které se obvykle používají v chemii peptidů. S výhodou je možno používat chránicích skupin urethanového typu, především pak je výhodnou skupinou benzyloxykarbonylová chránicí skupina.

Podle druhého možného způsobu se chrání aminoskupina v nižším alkylesteru alfa-aminokyseliny vhodnou chránicí skupinou, jako je některá z výše jmenovaných, načež se redukuje produkt s chráněnou aminoskupinou za teploty pod -40 °C v prostředí aromatického uhlovodíku, jako je toluen nebo benzen nebo některý z etherů, jako je diethylether nebo tetrahydrofuran působením hydridu kovu, jako je hydrid hlinitosodný, diisobutylaluminiumhydrid nebo natrium-bis-(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid za vzniku aminoaldehydu s chráněnou aminoskupinou.

Zpracovávali se takový aminoaldehyd, jak je to uvedeno výše, získá se tím 3-amino-2-hydroxynitril.

Fyziologické účinnosti bestatinu a odpovídajících sloučenin obecného vzorce II se stanovují takto:

a) Inhibiční účinnost proti aminopeptidase B

Testovací postup:

Byl modifikován způsob, který popsali V. K. Hopusu, K. K. Makinen, G. G. Glenner v Arch. Biochem. Biophys. 114, 557 (1966). Ke směsi 0,3 ml 1 mM roztoku beta-naftylamidu argininu a 1,0 ml 0,1 M hydrochloridového tris-pufu (pH 7,0) se za přítomnosti testovaného produktu nebo bez této látky přidá 0,7 ml destilované vody, a vše se zahřívá 3 minuty na 37 °C.

Reakce se zahájí přidáním 0,2 ml roztoku aminopeptidasy B, připraveného použitím chromatografie na sefadexu RG 100, jak to popsal Hopusu a spol. (viz výše).

Po 30 minutách uchovávání za teploty 37 °C se přidá 0,6 ml 1,0 M acetátového pufru (pH 4,2) obsahujícího diazoniovou sůl o-aminoazotoluenu v koncentraci 1,0 mg/ml a Tween 20 o koncentraci 1,0 %. Po 15 minutách za teploty místnosti se změří absorpce (a) při 530 nm spektrofotometrem. Pro kontrolu se podobným způsobem změří absorpce (b) po provedení reakce bez vlastního vzorku. Procento inhibice se propočte z rovnice:

$$(b-a)/b \cdot 100.$$

Byly změřeny procentové údaje inhibice za různých koncentrací a ze zjištěných % inhibice byla odvozena hodnota 50% inhibice (ID_{50}). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

T a b u l k a 1

Inhibiční účinnost bestatinu a příbuzných sloučenin proti aminopeptidase B.

látko č.	složení	ID_{50} (μg/ml)
1.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucin (bestatin)	0,10
2.	(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucin	1,25
3.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucin	0,56
4.	(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucin	0,04
5.	(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoylglycin	21,5
6.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-valin	0,55
7.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-isoleucin	0,05
8.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methionin	0,22
9.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutamin	1,2
10.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norvalin	0,17
11.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norleucin	0,13
12.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-fenylalanin	4,2
13.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-serin	0,72
14.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutamová kyselina	25
15.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(RS)-2-aminooktanová kyselina	3,1
16.	(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxypropionyl-(S)-leucin	16
17.	(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanoyl-(S)-leucin	12
18.	(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-3-fenylpropionyl-(S)-leucin	56
19.	(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucin	0,07
20.	(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucin	0,48
21.	(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-p-methylfenylbutanoyl-(S)-leucin	0,01
22.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-nitrofenylbutanoyl-(S)-leucin	0,01
23.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-aminofenylbutanoyl-(S)-leucin	0,10
24.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-cyklohexylbutanoyl-(S)-leucin	1,05
25.	(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucin	0,10
26.	(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucin	0,007

(B) Distribuce bleomycinu v orgánech za přítomnosti bestatinu.

100 mg/kg bleomycinu B_2 se subkutánně injikuje každému ze 3 sameček ICR myši (stáří 4 týdny) a podobně se podá subkutánně každé ze 3 stejně starých myšek současně 100 mg/kg bleomycinu B_2 a 100 mg/kg bestatinu.

Za hodinu po podání uvedených pátek se všech 6 myší usmrtí, a množství bleomycinu, které zůstane v séru a orgánech, se stanoví za použití tenké vrstvy na Petriho misce, přičemž jako testovací mikroorganismus se použije *Bacillus subtilis* PCI219. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2, číselné údaje jsou průměrné hodnoty $\mu\text{g/ml}$.

T a b u l k a 2

Vliv současného podání bestatinu a bleomycinu B_2 na distribuci bleomycinu v orgánech myši.

	sérum	plíce	pokožka	játra	ledviny	slezina	žaludek	mozek
bleomycin 100 mg/kg	110	11,2	4,5	0	68,0	4,0	1,6	0
bleomycin 100 mg/kg + bestatin 100 mg/kg	140	21,2	42,0	0	84,0	5,8	2,5	2,4

(C) Antikoncepční vlastnosti.

Účinek bestatinu proti oplození

Bezprostředně po subkutánním podání bestatinu v dávce 10 mg/kg samicám myšek ICR JCL v pubertálním věku se tyto myšky umístí dohromady se samicí podobného stáří. Samičky myši se po spáření usmrtí 2 dny po tvorbě vaginální zátky, a odeberou se vajíčka ke zjištění, zda byla oplodněna nebo nikoli. Oplodněná vajíčka byla z údobí 8 až 16 buněk.

Skupina myši po podání bestatinu	samička č.1	č.2	celkově N=2
corpus luteum, počet	10	19	29
odebraná vajíčka, počet	10	19	29
oplozená vajíčka	4 (40 %)	6 (31,6 %)	10 (34,5 %)
neoplozená vajíčka	6 (60 %)	13 (68,4 %)	19 (65,5 %)
Kontrola			
corpus luteum, počet	13	13	26
odebraná vajíčka, počet	9	11	20
oplozená vajíčka	6 (66,7 %)	8 (72,7 %)	14 (70 %)
neoplozená vajíčka	3 (33,3 %)	3 (27,3 %)	6 (30 %)

Z pokusu je patrné, že oplození vajíček, odebraných od myšek s kopulací 4 až 16 hodin po podání bestatinu, odpovídá 34,5 %, zatímco u kontrolní skupiny se jedná o hodnotu 70 %. Z těchto výsledků vyplývá, že se bestatin vyznačuje působením proti oplození.

Dále je rozbor postupů, jak lze provést přípravu látek podle vynálezu. Pokud se uvedených příkladů týká, pak je třeba zdůraznit, že se dá použít jakýkoli způsob pro zavedení vhodné chránicí funkční skupiny, jakýkoli způsob pro odstranění chránicí skupiny z funkční skupiny, jakož i jakýkoli jiný způsob řazení a spojování aminokyselin, jak je znám z chemie peptidů kromě těch, které jsou zde výslovně popsány.

Hodnoty R_f se vztahují k destičkám se silikagelem GF₂₅₄ (Merck) za použití soustavy n-butylalkohol : kyselina octová : voda (4:1:1) k vyvíjení.

Některé z 3-amino-2-hydroxykarboxylových kyselin a také peptidy, které je obsahují, mají 2 hodnoty R_f , protože se jedná o směsi konfigurací threo- a erythro-.

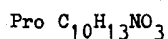
P ř í k l a d 1

Ve směsi 300 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 300 ml dioxanu se rozpustí 35,4 g olejovitého nitrilu benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny, a po přidání 21,2 g anisolu se reakční směs zahřívá 12 hodin do varu pod zpětným chladičem.

Za sníženého tlaku se oddestiluje dioxan, získaný vodný roztok se promyje etherem, vodný podíl se zahustí za sníženého tlaku až do sucha. Ke zbylé látce se přidá 200 ml vody, nerozpustný podíl se odfiltruje, přidá se stejné množství acetonu a pH reakční směsi se upraví přidáním vodného roztoku amoniaku na hodnotu 5,5. Reakční směs se ponechá v ledničce, vyloučené krystaly se odfiltrují a získá se tím 13,66 g očekávané kyseliny (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové.

$$[\alpha]_{578}^{27} + 16,8^\circ \quad (c = 1,25, \text{N HCl});$$

$$R_f = 0,23 \text{ a } 0,26$$



vypočteno: 61,52 % C, 6,71 % H, 7,18 % N;

nalezeno: 61,06 % C, 6,55 % H, 6,80 % N.

V 70 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného se rozpustí 13,66 g kyseliny (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové. Získaný roztok se energicky míchá za chlazení ledem, a během 30 minut se přidává ve 3 dávkách 15 ml benzyloxykarbonylchloridu a 70 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného. Potom se reakční směs míchá energicky hodinu za chlazení ledem a další 3 hodiny za teploty místnosti. Po skončení reakce se přidáním 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové upraví pH reakční směsi na hodnotu 1. Vyloučí se tím olejovitý produkt, který se extrahuje dvakrát do 100 ml ethylesteru kyseliny octové.

Ethylacetátová fáze se promyje vodou a vysuší bezvodým síranem hořečnatým. Po filtraci se filtrát zahustí za sníženého tlaku. Krystalováním zbytku ze směsi ethylesteru kyseliny octové a petroletheru se připraví 8,48 g opticky nečisté kyseliny benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové. Na druhé straně zahuštěním matečného louhu za sníženého tlaku a krystalizací zbytku z petroletheru se dá získat 8,07 g opticky nečisté kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové.

Látka má t. t. 142 až 143 °C. $[\alpha]_{578}^{23} + 70,2^\circ \quad (c = 1,44, \text{kyselina octová}).$

Směs 8,00 g opticky nečisté kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové a 10,35 g dihydrátu brucinu se rozpustí za zahřívání ve směsi 300 ml ethylesteru kyseliny octové a 10 ml methanolu. Po filtraci se filtrát ochladí, čímž se vyloučí sůl brucinu a kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové.

Vyloučené krystaly se odfiltrují a dvojitou krystalizací z ethylesteru kyseliny octové se získá 13,51 g čisté soli brucinu a kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové.

Látka má t. t. 144 °C, $[\alpha]_{578}^{21} + 33,8^\circ \quad (c = 1,12, \text{kyselina octová}).$

13,5 g z uvedených krystalů se suspenduje v 150 ml ethylesteru kyseliny octové a brucin se odstraní vytřepáním suspenze do 30 ml 1 N roztoků chlorovodíkové kyseliny. Vrstva ethylesteru kyseliny octové se promyje vodou a po vysušení bezvodým síranem hořečnatým se anorganický podíl odfiltruje, a ethylester kyseliny octové se oddestiluje ve vakuu. Přesrážením zbytku z roztoku ethylesteru kyseliny octové a petroletheru se získá 6,21 g benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny.

Látka má t. t. 154,5 °C, $[\alpha]_{578}^{24} + 84,5^\circ$ (c = 1,34, kyselina octová).

Pro $C_{18}H_{19}O_5N$

vypočteno: 65,64 % C, 5,82 % H, 4,25 % N;

nalezeno: 65,29 % C, 5,80 % H, 4,35 % N.

Benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina se hydrogenuje na palladiové černi v kyselině octové. Katalyzátor se filtruje, filtrát se pak zahustí za sníženého tlaku a odparek se rozmělní v acetonu. (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina se získá po filtraci v kvantitativním výtěžku.

$[\alpha]_{578}^{26} + 29,5^\circ$ (c = 0,97, 1 N kyselina chlorovodíková).

Pro $C_{10}H_{13}O_3N \cdot 1/3H_2O$

vypočteno: 59,67 % C, 6,85 % H, 6,96 % N;

nalezeno: 59,86 % C, 6,70 % H, 6,87 % N.

P ř í k l a d 2

Benzyloxykarbonyl-(2RS, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina se připraví benzyloxykarbonylací (2RS, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny postupem podle příkladu 1.

7,75 g benzyloxykarbonyl (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny a 6,69 g dehydroabietylaminu se smísí v etheru a těžce rozpustná dehydroabietylamoniová sůl benzyloxykarbonyl-(2R,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny se odfiltruje.

Přefiltrovaný etherický roztok se zahustí za sníženého tlaku a zbylý olejovitý materiál se nechá reagovat se směsí ethylacetátu a 1 N kyseliny chlorovodíkové a připraví se surová benzyloxykarbonyl-(2S,3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina.

Jestliže se krystaly dvakrát přesráží ze směsi ethylacetátu a petroletheru, získá se 2,16 g čisté benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny, t. t. 175 až 176 °C.

$[\alpha]_{578}^{25} + 5,6^\circ$ (c = 1,39 kyselina octová).

Benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina se hydrogenuje na palladiové černi v kyselině octové. Katalyzátor se odfiltruje a filtrát se pak zahustí za sníženého tlaku. Odparek se překrystaluje z acetonu.

Filtrací se v kvantitativním výtěžku získá (2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina.

$[\alpha]_{578}^{26} = -5,6^\circ$ (c = 0,99, 1 N kyselina chlorovodíková).

Pro $C_{10}H_{13}O_3N$

vypočteno: 61,52 % C, 6,71 % H, 7,18 % N;

nalezeno: 60,87 % C, 6,56 % H, 6,95 % N.

P ř í k l a d 3

Jestliže se (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanová kyselina terc.butoxykarbonyluje způsobem popsaným v práci T. Nagasawa a j. Bull. Chem. Soc. Japan 46, 1269 (1973) použitím terc.butyl-S-4,6-dimethylpyrimidin-2-ylthiolkarbonátu, získá se v 77 % výtěžku dicyklohexyl-amoniová sůl terc. butoxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny, t. t. 158 až 159 °C.

$$[\alpha]_{578}^{25} = + 51,9^{\circ} \text{ (c = 0,89, kyselina octová).}$$
Pro $C_{27}H_{44}O_5N_2$

vypočteno: 68,02 % C, 9,31 % H, 5,88 % N;

nalezeno: 67,83 % C, 9,52 % H, 5,68 % N.

P ř í k l a d 4

Jestliže se 9,0 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxypropionitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 1, získá se 3,16 g (2RS, 3R)-methylisoserinu.

$$[\alpha]_{578}^{22} = -0,6^{\circ} \text{ (c = 1,10, 1 N kyselina chlorovodíková). Rf = 0}$$
Pro $C_4H_9NO_3$

vypočteno: 40,33 % C, 7,62 % H, 11,76 % N;

nalezeno: 40,53 % C, 7,51 % H, 11,95 % N.

P ř í k l a d 5

2,76 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanonitrilu se rozpustí v 30 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 30 ml dioxanu. Po přidání 2,16 g anisolu se roztok zahřívá 4 hodiny k varu. Dioxan se oddestiluje za sníženého tlaku a zbylý chlorovodíkový roztok se promyje etherem. Vodná fáze se zahustí za sníženého tlaku k suchu.

Ke zbytku se přidá voda a roztok se adsorbuje na koloně plněné iontoměničím Dowex 50X4 (H typ). Po promytí vodou se adsorbovaný materiál eluuje 4 N vodným roztokem hydroxidu amonového. Eluovaný roztok se pak zahustí za sníženého tlaku k suchu.

Jakmile se ke zbytku přidá směs acetonu a vody (1:1), vzniknou krystaly, které se odfiltrují. Získá se tak 0,82 g (2RS, 3R)-isobutylisoserinu.

$$[\alpha]_{578}^{22} = -8,3^{\circ} \text{ (c = 1,0, kyselina octová). Rf = 0,18.}$$

P ř í k l a d 6

Jestliže se 3,0 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-3-fenylpropionitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 1, získá se 0,80 g (2RS, 3R)-fenylisoserinu.

$[\alpha]_{578}^{25} = +9,5^{\circ}$ ($c = 1,0$, 1 N kyselina chlorovodíková) $R_f = 0,13$ a $0,17$.

Pro $C_9H_{11}NO_3$

vypočteno: 59,66 % C, 6,12 % H, 7,73 % N;

nalezeno: 59,18 % C, 6,15 % H, 7,67 % N.

P ř í k l a d 7

Jestliže se 10,3 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylbutyronitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 1, získá se 3,10 g (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylbutanové kyseliny.

$R_f = 0,25$.

Pro $C_{10}H_{12}NO_3Cl$

vypočteno: 52,29 % C, 5,27 % H, 6,10 % N;

nalezeno: 52,11 % C, 5,17 % H, 5,99 % N.

P ř í k l a d 8

Jestliže se 10,3 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylbutyronitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 1, získá se 4,82 g (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylbutanové kyseliny.

$R_f = 0,25$ a $0,29$.

Pro $C_{10}H_{12}NO_3Cl$

vypočteno: 52,29 % C, 5,27 % H, 6,10 % N;

nalezeno: 52,01 % C, 5,17 % H, 5,91 % N.

P ř í k l a d 9

Jestliže se 11,2 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-methylfenylbutyronitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 1, získá se 3,41 g (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-methylfenylbutanové kyseliny.

$R_f = 0,20$.

Pro $C_{11}H_{15}NO_3$

vypočteno: 63,14 % C, 7,23 % H, 6,99 % N;

nalezeno: 62,94 % C, 7,01 % H, 6,79 % N.

P ř í k l a d 10

22,0 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-methoxyfenylbutyronitrilu se rozpustí ve směsi 200 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 200 ml di-oxanu. Po přidání 13,2 g anisolu se reakční směs zahřívá 12 hodin k varu.

Dioxan se pak oddestiluje za sníženého tlaku a zbylý vodný roztok se pak promyje etherem. Vodná fáze se zahustí za sníženého tlaku a odpaří k suchu. K odparku se přidá 100 ml vody a nerozpustný podíl se odfiltruje. Po přidání stejného množství acetonu se upraví vodným amoniakem pH na 5,5. Směs se nechá stát v lednici. Vyloučené krystaly se odfiltrují a získá se 6,73 g požadované (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanové kyseliny.

P ř í k l a d 11

Jestliže se 30 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutyronitrilu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 10, získá se 12,61 g (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanové kyseliny.

R_f = 0,20.

Pro C₁₀H₁₂NO₄

vypočteno: 58,81 % C, 5,92 % H, 7,82 % N;

nalezeno: 58,63 % C, 5,99 % H, 7,43 % N.

Jestliže se (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanová kyselina benzyloxykarbonyluje použitím benzyl-(S)-4,6-dimethylpyrimidin-2-ylthiokarbonátu a pak se nechá reagovat s dicyklohexylaminem, získá se benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanová kyselina ve formě dicyklohexylamoniové soli.

15,22 g surové dicyklohexylamoniové soli se krystaluje z methanolu, ethylacetátu a petroletheru a získá se 3,2 g opticky nečisté dicyklohexylamoniové soli benzyloxykarbonyl-(2R, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanové kyseliny v prvním krystalickém podílu.

Jestliže se matečné louhy odpaří k suchu a zbytek se třikrát přesráží z ethylacetátu a etheru, získá se 5,02 g opticky čisté dicyklohexylamoniové soli benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanové kyseliny, t. t. 121 až 122 °C,

[α]_D²⁰₅₇₈ = +55,3° (c = 4,22, kyselina octová).

Pro C₃₀H₄₂N₂O₆

vypočteno: 69,46 % C, 8,16 % H, 6,17 % N;

nalezeno: 69,81 % C, 8,35 % H, 6,42 % N.

Srovnávací příklad 1

Syntéza nitrilu z aldehydu

Roztok sestávající z 20,8 g hydrogensířičitanu sodného a 50 g vody se přidá k asi 52,7 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(R)-fenylalaninalu a vyloučený adiční produkt se odfiltruje a promyje vodou a etherem. Připraví se tak 77 g surové sodné soli 2-benzyloxykarbonylamino-1-hydroxy-3-fenylpropansulfonové kyseliny.

68 g vzniklého aduktu se suspenduje v 250 ml vody a ochladí se na 10 až 12 °C. Po přidání 500 ml etheru se během 30 minut přikape roztok 13 g kyanidu draselného v 100 ml vody.

Směs se pak nechá reagovat 3 hodiny při teplotě místnosti a vodná fáze se vyleje. Etherická fáze se promyje vodným roztokem chloridu sodného a vysuší bezvodým síranem hořečnatým.

Po odfiltrování síranu hořečnatého se ether oddestiluje za sníženého tlaku a získá se 49 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutyronitrilu.

Ostatní nitrily používané v předloženém vynálezu se připravují obdobně výše zmíněným způsobem.

Srovnávací příklad 2

2,25 g benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné kyseliny a 945 mg N-hydroxybenzotriazolu se rozpustí v 70 ml tetrahydrofuranu. Po přidání 2,75 g soli benzylesteru leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou se reakční směs neutralizuje přidáním 0,98 ml triethylaminu, ochladí se na -5°C , přidá se 1,40 g N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu, načež se reakční směs ponechá stát po dobu jedné noci.

Tetrahydrofuran se potom oddestiluje za sníženého tlaku, ke zbytku se přidá 200 ml ethylesteru kyseliny octové, nerozpustné podíly se odfiltrují, filtrát se promyje 1 N roztokem kyseliny sírové, vodou, 5% vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou (přesně v uvedeném pořadí), načež se organický roztok vysuší bezvodým síranem hořečnatým. Filtrát se zahustí za sníženého tlaku, a získaný zbytek tuhne po přidání směsi ethylesteru kyseliny octové a petroletheru. Krystalizací ze stejné směsi rozpouštědél se získá benzylester benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 122 až 123 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{578}^{23} + 14,2^{\circ}$ ($c = 1$, kyselina octová).

Pro $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$

vypočteno: 69,90 % C, 6,81 % H, 5,26 % N;

nalezeno: 69,66 % C, 7,01 % H, 5,13 % N.

V 100 ml methanolu se rozpustí 3,22 g benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu a po přidání 100 mg palladiové černi se roztok hydrogenuje po 3 hodiny.

Katalyzátor se odfiltruje a filtrát se zahustí za sníženého tlaku. Krystalizací zbytku ze směsi methanolu a ethylesteru kyseliny octové se získá 889 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu. Látka má t. t. 208 až 213 $^{\circ}\text{C}$ (za rozkladu).

$[\alpha]_{578}^{21} = -23,5^{\circ}$ ($c = 0,48$, kyselina octová). Hodnota $R_f = 0,48$.

Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$

vypočteno: 62,31 % C, 7,85 % H, 9,09 % N;

nalezeno: 62,61 % C, 7,86 % H, 8,83 % N.

Srovnávací příklad 3

Směs 85 mg N-hydroxysukcinimidoesteru kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné a 86 mg soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou se ponechá reagovat 12 hodin v prostředí 5 ml dioxanu za teploty místnosti a za přítomnosti 0,03 ml triethylaminu.

Reakční směs se zahustí za sníženého tlaku, zbytek se extrahuje do ethylesteru kyseliny octové. Roztok v tomto rozpouštědle se promyje 1 N roztokem sírové kyseliny, potom vodou, 5% vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, vždy v uvedeném pořadí.

Po vysušení bezvodým síranem hořečnatým se oddestilováním rozpouštědla připraví pevný zbytek, který se překrystaluje z ethylesteru kyseliny octové přidáním petroletheru. Získá se tak 90 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoylleucinu.

Látka má t. t. 122 °C, $[\alpha]_{578}^{20} + 15,1^{\circ}$ (c = 0,77, kyselina octová).

Podobně, jak je popsáno ve srovnávacím příkladu 2, se získá z 75 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu 33 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má $[\alpha]_{578}^{25} - 21,8^{\circ}$ (c = 0,45, kyselina octová). Rf = 0,48.

Srovnávací příklad 4

Provede se reakce směsi 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenyl-máselné kyseliny, připravené podobně, jak je popisováno v příkladu 1, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu 217 mg hydrochloridu methylesteru (S)-leucinu, 0,17 ml triethylaminu a 206 mg N,N-dicyklohexylkarbodiimidu. Reakce se provede podle příkladu 1, a připraví se tím 293 mg methylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 120 °C, $[\alpha]_{578}^{24} - 22,1^{\circ}$ (c = 1,09, kyselina octová).

Pro $C_{25}H_{32}N_2O_6$

vypočteno: 65,77 % C, 7,07 % H, 6,14 % N;

nalezeno: 65,91 % C, 7,16 % H, 6,28 % N.

V 10 ml methanolu se rozpustí 250 mg methylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu, k roztoku se přidá 0,6 ml 1 N vodného roztoku hydroxidu sodného a reakční směs se míchá 6 hodin za teploty místnosti.

Methanol se dále oddestiluje za sníženého tlaku, ke zbylému kapalnému podílu se přidá voda, a okyselením 1 N roztokem kyseliny sírové se upraví pH na hodnotu 2. Vysrážený podíl se extrahuje do ethylesteru kyseliny octové, roztok se promyje vodou, potom se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo se po filtraci oddestiluje. Zbýlý pevný podíl se překrystaluje ze směsi ethylesteru kyseliny octové a petroletheru.

Opakovanou krystalizací se získá 150 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 209 °C, $[\alpha]_{578}^{31} + 27,2^{\circ}$ (c = 0,71, kyselina octová).

Pro $C_{24}H_{30}N_2O_6$

vypočteno: 65,14 % C, 6,75 % H, 6,46 % N;

nalezeno: 65,29 % C, 6,75 % H, 6,33 % N.

V 30 ml methanolu se rozpustí 120 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu a po přidání 50 mg palladiové černi se reakční směs hydrogenuje 3 hodiny.

Katalyzátor se odfiltruje a z filtrátu se oddestiluje methanol. Získá se tím 54 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu (krystalizace z methanolu a ethylesteru kyseliny octové).

$[\alpha]_{578}^{23} - 22,7^\circ$ ($c = 0,95$, kyselina octová), $R_f = 0,48$.

Srovnávací příklad 5

85 mg N-hydroxysukcinimidoesteru kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné se nechá reagovat s 54 mg (S)-leucinu v 5 ml dioxanu a 5 ml vody za přítomnosti 0,03 ml triethylaminu stáním 2 dny za teploty místnosti.

Reakční směs se zahustí za sníženého tlaku, ke zbytku se přidá 30 ml vody, a pH roztoku se přidáním 1 N roztoku kyseliny sírové upraví na hodnotu 2. Okyselený roztok se extrahuje do ethylesteru kyseliny octové (50 ml), roztok v uvedeném rozpouštědle se promyje 1 N roztokem kyseliny sírové, vodou, 5% vodným roztokem hydrogenouhličitanu sodného a opět vodou v uvedeném pořadí, načež se roztok vysuší bezvodým síranem hořečnatým, po filtraci se ethylester kyseliny octové oddestiluje, a zbylý pevný podíl se překrystaluje z ethylesteru kyseliny octové přidáním petroletheru.

Přesrážejí-li se krystaly ze stejné kombinace rozpouštědel, získá se tím 63 mg očekávaného benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 209°C , $[\alpha]_{578}^{24} + 26,7^\circ$ ($c = 0,55$, kyselina octová).

Zpracuje-li se 45 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu podobným způsobem, jak je to popsáno v příkladu 4, získá se tím 15 mg bestatinu.

Látka má $[\alpha]_{578}^{24} - 22,3^\circ$ ($c = 0,52$, kyselina octová), $R_f = 0,48$.

Srovnávací příklad 6

Podobně jako je to popsáno v příkladu 2, se 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné kyseliny nechá reagovat s 472 mg soli benzylesteru (R)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a připraví se 450 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxybutanoyl-(R)-leucinu.

Látka má t. t. 118 až 119°C , $[\alpha]_{578}^{23} + 43,0^\circ$ ($c = 1,23$, kyselina octová).

Jestliže se zpracuje 430 mg takto připraveného benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucinu podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, získá se 144 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

$[\alpha]_{578}^{28} + 0,9^\circ$ ($c = 0,47$, kyselina octová), $R_f = 0,49$.

Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$

vypočteno: 62,31 % C, 7,85 % H, 9,09 % N;

nalezeno: 62,47 % C, 7,89 % H, 9,09 % N.

Srovnávací příklad 7

Směs 660 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné, 944 mg benzylesteru (S)-leucinu ve formě soli s kyselinou p-toluensulfonovou, 324 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,34 ml triethylaminu a 412 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak to bylo popsáno ve srovnávacím příkladu 1, a získá se tím 710 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 128 °C, $[\alpha]_{578}^{25} - 38,0^{\circ}$ ($c = 0,81$, kyselina octová).

Z 500 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu se podobně, jak to bylo popsáno ve srovnávacím příkladu 2, připraví 270 mg (2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

$[\alpha]_{578}^{24} - 61,3^{\circ}$ ($c = 0,56$, kyselina octová). $R_f = 0,37$.

Pro $C_{16}H_{24}N_2O_4$

vypočteno: 62,31 % C, 7,85 % H, 9,09 % N;

nalezeno: 61,99 % C, 7,71 % H, 9,13 % N.

Srovnávací příklad 8

Směs 165 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé, 237 mg soli benzylesteru (R)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 81 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,08 ml triethylaminu a 103 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobným způsobem, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, připraví se tím benzylester benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucinu (180 mg).

Látka má t. t. 128 až 129 °C, $[\alpha]_{578}^{23} - 11,0^{\circ}$ ($c = 1,02$, kyselina octová).

Podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, získá se z 155 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucinu 72,1 mg (2S, 3S)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(R)-leucinu.

$[\alpha]_{578}^{28} - 31,4^{\circ}$ ($c = 0,47$, kyselina octová), $R_f = 0,52$.

Pro $C_{16}H_{24}N_2O_4$

vypočteno: 62,31 % C, 7,85 % H, 9,09 % N;

nalezeno: 62,07 % C, 7,63 % H, 8,80 % N.

Srovnávací příklad 9

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé, 405 mg soli benzylesteru glycinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobným způsobem, jak to bylo popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Připraví se tím olejovitý benzylester benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoylglycinu. Při testování chromatografickým na tenké vrstvě bylo zjištěno, že produkt je jednotný a čistý.

Zpracováním olejovitého produktu podle postupu srovnávacího příkladu 2 se získá 117 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoylglycinu

$[\alpha]_{578}^{23} - 7,4^{\circ}$ ($c = 0,49$, kyselina octová). $R_f = 0,26$.

Pro $C_{12}H_{16}O_4N_2 \cdot CH_3OH$

vypočteno: 54,92 % C, 7,09 % H, 9,87 % N;

nalezeno: 54,33 % C, 6,87 % H, 9,69 % N.

Srovnávací příklad 10

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné, 440 mg hydrochloridu o-nitrobenzylesteru (S)-benzylserinu, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se tím 540 mg p-nitrobenzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-benzylserinu.

Látka má t. t. 121,5 °C, $[\alpha]_{578}^{22} + 17,7^\circ$ (c = 1,07, kyselina octová).

Zpracováním 500 mg p-nitrobenzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-benzylserinu postupem podle srovnávacího příkladu 2 se získá 147 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-serinu.

$[\alpha]_{578}^{26} - 9,0^\circ$ (c = 0,50, kyselina octová), Rf = 0,20.

Pro $C_{13}H_{18}O_5N_2 \cdot H_2O$

vypočteno: 51,99 % C, 6,71 % H, 9,33 % N;

nalezeno: 51,39 % C, 6,74 % H, 8,97 % N.

Srovnávací příklad 11

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné, 400 mg hydrochloridu benzylesteru (S)-glutaminu, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracovává obdobně podle srovnávacího příkladu 2.

Získá se tím 200 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutaminu.

Látka má t. t. 155 °C, $[\alpha]_{578}^{22} + 62,3^\circ$ (c = 0,75, kyselina octová).

Zpracuje-li se 180 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutaminu podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, získá se 61 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutaminu.

Látka má $[\alpha]_{578}^{23} - 9,9^\circ$ (c = 0,37, kyselina octová), Rf = 0,17.

Pro $C_{15}H_{21}O_5N_3 \cdot 2H_2O$

vypočteno: 50,13 % C, 7,01 % H, 11,69 % N;

nalezeno: 50,64 % C, 6,32 % H, 11,61 % N.

Srovnávací příklad 12

Směs 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné kyseliny, 600 mg soli benzylesteru (S)-O-benzylglutaminu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracovává podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se 605 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-O-benzylglutaminu.

Látka má t. t. 119 až 120 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 28,6^\circ$ (c = 1,04, kyselina octová).

Zpracováním 250 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbu-

tanoyl-(S)-O-benzylglutaminu postupem podle srovnávacího příkladu 2, se získá 166 mg kyseliny (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-glutamové.

Látka má $[\alpha]_{578}^{23} - 18,4^{\circ}$ ($c = 0,51$, kyselina octová), $R_f = 0,27$.

Pro $C_{15}H_{20}O_6N_2$

vypočteno: 55,55 % C, 6,22 % H, 8,64 % N;

nalezeno: 55,20 % C, 5,90 % H, 8,20 % N.

Srovnávací příklad 13

Směs 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé kyseliny, 455 mg soli benzylesteru (S)-valinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracovává podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Získá se tak 397 mg O-benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-valinu.

Látka má t. t. 96,5 až 97 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 19,2^{\circ}$ ($c = 0,99$, kyselina octová).

Jestliže se 376 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-valinu zpracovává podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, získá se 104 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-valinu

$[\alpha]_{578}^{26} - 1,4^{\circ}$ ($c = 0,55$, kyselina octová), $R_f = 0,42$.

Pro $C_{15}H_{22}O_4N_2$

vypočteno: 61,20 % C, 7,53 % H, 9,52 % N;

nalezeno: 60,98 % C, 7,59 % H, 9,28 % N.

Srovnávací příklad 14

Směs 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé kyseliny, 455 mg soli benzylesteru (S)-norvalinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracovává podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Získá se 310 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norvalinu.

Látka má t. t. 114 až 115 °C, $[\alpha]_{578}^{24} + 22,0^{\circ}$ ($c = 0,49$, kyselina octová).

Zpracováním 250 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norvalinu podle postupu ze srovnávacího příkladu 2 se získá 110 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norvalinu.

$[\alpha]_{578}^{31} - 14,5^{\circ}$ ($c = 0,50$, kyselina octová), $R_f = 0,41$.

Pro $C_{15}H_{22}O_4N_2$

vypočteno: 59,33 % C, 7,64 % H, 9,23 % N;

nalezeno: 59,42 % C, 7,58 % H, 9,09 % N.

Srovnávací příklad 15

Odstraní-li se dicyklohexylamin z 952 mg soli terc.butoxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečné kyseliny s dicyklohexylaminem reakcí s 1 N roztokem kyseliny sírové a ethylesterem kyseliny octové, získá se olejovitá kyselina terc.butoxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmásečná.

Tento olejovitý podíl a 440 mg hydrochloridu methylesteru (S)-methioninu se suspenduje v 20 ml tetrahydrofuranu a reakční směs se neutralizuje přidáním 0,308 ml triethylaminu.

Takto připravený roztok se ochladí na -5°C , přidá se 412 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu, reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti, načež se vyloučené krystaly odfiltrují a matečný louh se zahustí za sníženého tlaku.

Zbytek se rozpustí v 200 ml ethylesteru kyseliny octové, tento roztok se promyje 1 N roztokem kyseliny sírové, vodou, 5% vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a potom opět vodou, v uvedeném pořadí, načež se organický roztok vysuší bezvodým síranem hořečnatým.

Zbytek, který se získá zahuštěním matečného louhu za sníženého tlaku, se rozpustí ve směsi ethylesteru kyseliny octové a benzeny (2:5), a roztok se nanese na kolonu chromatografického silikagelu G (Merck).

Jímají se frakce, obsahující očekávanou látku, rozpouštědlo se oddestiluje za sníženého tlaku a překrystalováním pevného zbytku ze směsi etheru a petroletheru se získá 380 mg methylesteru terc.butoxy-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methioninu.

Látka má t. t. 118°C , $[\alpha]_{578}^{24} + 51,4^{\circ}$ ($c = 0,56$, kyselina octová).

Jestliže se zpracovává postupem, popsaným ve srovnávacím příkladu 4 280 mg methylesteru terc.butoxy-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methioninu, získá se 200 mg terc.butoxy-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methioninu.

Látka má t. t. 116°C , (za pění), $[\alpha]_{578}^{22} + 44,1^{\circ}$ ($c = 0,54$, kyselina octová).

Ke 150 mg terc.butoxy-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methioninu se přidá 0,2 ml kyseliny thioglykolové a 50% vodný roztok kyseliny trifluoroctové, a reakční směs se míchá hodinu za teploty místnosti.

Olejovitý podíl, který se získá zahuštěním reakční směsi za sníženého tlaku se rozpustí ve vodě, a provede se adsorpce na koloně objemu 5 ml s náplní pryskyřice Dowex 50X4 (ve vodíkovém cyklu).

Adsorbovaný materiál se eluuje 2 N vodným roztokem amoniaku, načež se zahuštěním do sucha získá z eluátu pevný materiál. Krystalováním tohoto podílu ze směsi vody a acetonu (1:1) se získá 87 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-methioninu.

$[\alpha]_{578}^{27} - 20,4^{\circ}$ ($c = 0,49$, kyselina octová), $R_f = 0,37$.

Pro $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$

vypočteno: 53,67 % C, 6,91 % H, 8,35 % N;

nalezeno: 53,64 % C, 6,47 % H, 8,11 % N.

Srovnávací příklad 16

Směs 330 mg benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanové kyseliny, 472 mg soli benzylesteru (S)-isoleucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně jak je popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se 466 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-isoleucinu.

Látka má t. t. 100 až 101 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 23,6^\circ$ (c = 1,0, kyselina octová).

Zpracováním 440 mg výše uvedené látky postupem podle srovnávacího příkladu 2 se získá 191 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-isoleucinu.

$[\alpha]_{578}^{26} + 6,4^\circ$ (c = 0,52, kyselina octová), Rf = 0,48.

Pro $C_{16}H_{24}O_4N_2$

vypočteno: 62,31 % C, 7,85 % H, 9,09 % N;

nalezeno: 62,31 % C, 7,70 % H, 8,99 % N.

Srovnávací příklad 17

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé, 472 mg soli benzylesteru (S)-norleucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se 437 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norleucinu.

Látka má t. t. 114 až 115 °C, $[\alpha]_{578}^{24} + 23,3^\circ$ (c = 0,94, kyselina octová).

Z 350 mg výše uvedené sloučeniny se získá za použití postupu podle srovnávacího příkladu 2, 160 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-norleucinu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{31} - 8,9^\circ$ (c = 0,70, kyselina octová), Rf = 0,47.

Pro $C_{16}H_{24}O_4N_2 \cdot H_2O$

vypočteno: 58,88 % C, 8,03 % H, 8,58 % N;

nalezeno: 58,95 % C, 7,84 % H, 8,60 % N.

Srovnávací příklad 18

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé, 505 mg soli benzylesteru kyseliny (RS)-2-aminooctanové s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobným způsobem, jak to bylo popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se 430 mg benzylesteru kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(RS)-2-aminooctanové.

Látka má t. t. 90 až 92 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 32,9^\circ$ (c = 0,94, kyselina octová).

Zpracuje-li se 250 mg výše uvedené sloučeniny postupem podle srovnávacího příkladu 2, získá se 74 mg kyseliny (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(RS)-2-aminooctanové.

Látka má $[\alpha]_{578}^{21} - 34,9^\circ$ ($c = 0,53$, kyselina octová), $R_f = 0,58$.

Pro $C_{18}H_{28}O_4N_2$

vypočteno: 64,26 % C, 8,39 % H, 8,33 % N;

nalezeno: 64,43 % C, 8,18 % H, 8,02 % N.

Srovnávací příklad 19

Směs 330 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylmáslé, 513 mg soli benzylesteru (S)-fenylalaninu s kyselinou p-toluensulfonovou, 162 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2 a získá se 378 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-fenylalaninu.

Látka má t. t. 111 až 112 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 39,6^\circ$ ($c = 0,97$, kyselina octová).

Zpracovávali se 355 mg výše uvedené sloučeniny postupem podle srovnávacího příkladu 2, získá se 108 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-fenylalaninu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{23} + 0,4^\circ$ ($c = 0,46$, kyselina octová), $R_f = 0,44$.

Pro $C_{19}H_{22}O_4N_2 \cdot CH_3OH$

vypočteno: 64,15 % C, 7,00 % H, 7,48 % N;

nalezeno: 63,58 % C, 6,45 % H, 7,57 % N.

Srovnávací příklad 20

Zpracovávali se směs 1,10 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-methylisoserinu, připraveného benzyloxykarbonylací (2RS, 3R)-methylisoserinu, 1,97 g soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 675 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,70 ml triethylaminu a 948 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu postupem popsaným ve srovnávacím příkladu 2, získá se tím olejovitý benzylester benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-methylisoserinyl-(S)-leucinu.

Podle vyhodnocení chromatografií na tenké vrstvě je tento olejovitý produkt čistý.

Zpracovávali se výše uvedený olejovitý produkt postupem podle srovnávacího příkladu 2, získá se tím 765 mg (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxypropionyl-(S)-leucinu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{29} - 28,7^\circ$ ($c = 1,09$, kyselina octová).

Pro $C_{10}H_{20}N_2O_4$

vypočteno: 51,70 % C, 8,68 % H, 12,06 % N;

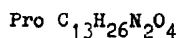
nalezeno: 51,49 % C, 8,42 % H, 11,96 % N.

Srovnávací příklad 21

1,32 g olejovitého benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-isobutylisoserinu, připraveného benzyloxykarbonylováním (2RS, 3R)-isobutylisoserinu, získaného při výše uvedeném postupu, 1,76 g soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 0,60 g N-hydroxybenzotriazolu, 0,63 ml triethylaminu a 0,92 g N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje postupem podle srovnávacího příkladu 2 za vzniku olejovitého benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-iso-

butylisoseryl-(S)-leucinu. Zpracuje-li se tento produkt podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2, získá se 0,37 g (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanoyl-(S)-leucinu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{22} - 26,6^{\circ}$ ($c = 1,0$, kyselina octová), $R_f = 0,43$ a $0,49$.



vypočteno: 56,91 % C, 9,55 % H, 10,21 % N;

nalezeno: 57,01 % C, 9,80 % H, 10,14 % N.

Srovnávací příklad 22

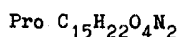
Směs 250 mg benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-fenylisoserinu t. t. 170 až 171 °C, $[\alpha]_{578}^{23} + 18,5^{\circ}$ ($c = 0,47$, kyselina octová), připraveného benzyloxykarbonylováním (2RS, 3R)-fenylisoserinu, 394 mg soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 130 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,14 ml triethylaminu a 165 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Získá se tím 285 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-fenylisoseryl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 93 až 95 °C $[\alpha]_{578}^{23} - 34,7^{\circ}$ ($c = 0,49$, kyselina octová).

Zpracováním 200 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3R)-fenylisoseryl-(S)-leucinu postupem podle příkladu 2 se získá 45 mg (2RS, 3R)-3-amino-2-hydroxy-3-fenylpropionyl-(S)-leucinu.

$[\alpha]_{578}^{25} - 2,4^{\circ}$ ($c = 0,33$, kyselina octová).



vypočteno: 61,20 % C, 7,53 % H, 9,52 % N;

nalezeno: 60,92 % C, 7,67 % H, 9,46 % N.

Srovnávací příklad 23

Směs 1,81 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylmásečné kyseliny t. t. 147 °C, připravené benzyloxykarbonylováním kyseliny (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylmásečné, 2,37 g soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 810 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,84 ml triethylaminu a 1,03 g N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Získá se tím 2,50 g benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 122 až 124 °C, $[\alpha]_{578}^{27} - 12,3^{\circ}$ ($c = 3,18$, kyselina octová).

Zpracuje-li se 1,50 g právě uvedené látky postupem, který je popsán ve srovnávacím příkladu 2, získá se tak 650 mg (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{26} - 11,3^{\circ}$ ($c = 1,33$, kyselina octová), $R_f = 0,42 = 0,52$.

Pro $C_{16}H_{23}N_2O_4Cl$

vypočteno: 56,05 % C, 6,76 % H, 8,17 % N;
nalezeno: 55,88 % C, 7,29 % H, 8,11 % N.

Srovnávací příklad 24

Směs 726 mg kyseliny benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylmáse-
selné t. t. 136,5 °C, připravené benzyloxykarbonylováním kyseliny (2RS, 3RS)-3-amino-2-
-hydroxy-4-o-chlorfenylmáse- selné kyseliny, 944 mg soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou
p-toluensulfonovou, 324 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,34 ml triethylaminu a 412 mg dicyklo-
hexylkarbodiimidu se zpracuje podobně, jak to bylo popsáno ve srovnávacím příkladu 2.

Získá se tím 747 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-
-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má t. t. 129 až 132 °C, $[\alpha]_{578}^{22} = 29,1^\circ$ (c = 1,02, kyselina octová).

Zpracuje-li se 640 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-
-o-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucinu podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím příkladu 2,
získá se 107 mg (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-o-chlorfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má specifickou rotaci $[\alpha]_{578}^{21} = 20,8^\circ$ (c = 0,48, kyselina octová), Rf = 0,46.

Pro $C_{16}H_{23}N_2O_4Cl$

vypočteno: 56,05 % C, 6,76 % H, 8,17 % N;
nalezeno: 56,21 % C, 6,56 % H, 7,90 % N.

Srovnávací příklad 25

Směs 1,57 g kyseliny benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-methylfenylmá-
selné, t. t. 166,5 až 168 °C, připravené benzyloxykarbonylací kyseliny (2RS, 3RS)-3-amino-
-2-hydroxy-4-p-methylfenylmáse- selné, 1,42 g soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-to-
luensulfonovou, 486 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,50 ml triethylaminu a 618 mg dicyklohexyl-
karbodiimidu se zpracuje obdobně podle srovnávacího příkladu 2.

Získá se tím v olejovité formě benzylester benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-
-hydroxy-4-fenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Zpracovává-li se tento olejovitý produkt podobně, jak je to popsáno ve srovnávacím
příkladu 2, získá se 497 mg (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-methylfenylbutanoyl-(S)-leuci-
nu.

Látka má Rf = 0,58 a 0,53, $[\alpha]_{578}^{25} = 7,2^\circ$ (c = 0,96, kyselina octová).

Pro $C_{17}H_{26}N_2O_4$

vypočteno: 63,33 % C, 8,13 % H, 8,69 % N;
nalezeno: 63,08 % C, 8,23 % H, 8,49 % N.

Srovnávací příklad 26

V 5 ml kyseliny octové se za přidání 5 ml ethanolu rozpustí 103 mg bestatinu, a reakční směs se hydrogenuje katalyticky 14 hodin na oxidu platičitém. Po filtraci se filtrát zahustí za sníženého tlaku do sucha, a triturováním zbytku s ethylesterem kyseliny octové se po filtraci získá 61 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-cyklohexylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má $R_f = 0,47$, $[\alpha]_{578}^{22} - 30,5^\circ$ ($c = 0,67$, kyselina octová).

Pro $C_{16}H_{30}N_2O_4$

vypočteno: 61,12 % C, 9,62 % H, 8,91 % N;

nalezeno: 62,12 % C, 9,52 % H, 8,81 % N.

Srovnávací příklad 27

300 mg bestatinu se suspenduje v 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 0,3 ml dýmavé kyseliny dusičné při 0°C . Reakce se nechá probíhat hodinu za uvedené teploty; během této doby se suspendovaný produkt rozpustí. Reakční směs se zředí vlitím do 100 ml vody a provede se adsorpce na koloně s náplní pryskyřice Dowex 50X4 (vodíkový cyklus). Adsorbovaný materiál se eluuje do 2 N vodného roztoku amoniaku, roztok se zahustí do sucha, zbytek se rozpustí v 10 ml vody, roztok se filtruje a lyofilizováním filtrátu se získá 213 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-nitrofenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má $[\alpha]_{578}^{28} + 5,2^\circ$ ($c = 0,5$, kyselina octová), $R_f = 0,58$.

Pro $C_{16}H_{23}N_3O_6$

vypočteno: 54,28 % C, 6,58 % H, 11,88 % N;

nalezeno: 54,38 % C, 6,56 % H, 11,89 % N.

Srovnávací příklad 28

100 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-nitrofenylbutanoyl-(S)-leucinu, jak se získá ve srovnávacím příkladu 27, se rozpustí v 10 ml methanolu a roztok se hydrogenuje 5 hodin na palladiové černi. Katalyzátor se filtruje, filtrát se zahustí za sníženého tlaku, zbytek se rozpustí v 5 ml vody, a po filtraci se lyofilizováním filtrátu získá 81 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-aminofenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Látka má $[\alpha]_{578}^{28} - 23,2^\circ$ ($c = 0,5$, kyselina octová), $R_f = 0,25$.

Pro $C_{16}H_{25}N_3O_4$

vypočteno: 59,42 % C, 7,79 % H, 13,00 % N;

nalezeno: 59,01 % C, 7,91 % H, 12,81 % N.

Srovnávací příklad 29

2,11 g (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylaminobutanové kyseliny připravené v příkladu 10 se rozpustí v 10 ml 1 N roztoku hydroxidu sodného. Za intenzivního míchání a chlazení ledem se ve třech dávkách přidá během 30 minut 4,5 ml benzyloxykarbonylchloridu.

Reakční směs se 1 hodinu intenzivně míchá za chlazení ledem a 3 hodiny při teplotě místnosti. Během reakce se pH reakce upravuje 1 N roztokem hydroxidu sodného na 8 až 9.

Po skončení reakce se přidává 6 N kyseliny chlorovodíkové a reakční směs se upraví na pH 2. Vyloučený olejovitý produkt se pak dvakrát extrahuje po 100 ml ethylacetátu. Ethylacetátová fáze se promyje vodou a dehydratuje se k suchu použitím bezvodého síranu hořečnatého.

Po odfiltrování síranu hořečnatého se filtrát zahustí za sníženého tlaku a odparek se krystaluje ve směsi ethylacetátu a petroletheru. Získá se 3,64 g benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-benzyloxykarbonyloxyfenylbutanové kyseliny t. t. 138 až 140 °C.

479 mg benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-benzyloxykarbonyloxyfenylbutanové kyseliny a 162 mg N-hydroxybenzotriazolu se rozpustí v 10 ml tetrahydrofuranu. Po přidání 472 mg soli benzylesteru (S)-leucinu a p-toluensulfonovou kyselinou se směs neutralizuje přidáním 0,168 ml triethylaminu a ochladí se na -5 °C.

Pak se přidá 206 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a reakční směs se nechá stát přes noc. Tetrahydrofuran se oddestiluje za sníženého tlaku a přidá se 30 ml ethylacetátu. Po odfiltrování nerozpustného podílu se filtrát promyje 1 N kyselinou sírovou, vodou, 5% vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a vodou v uvedeném pořadí. Po vysušení bezvodým síranem hořečnatým se filtrát zahustí za sníženého tlaku. Získaný odparek ztuhne ve směsi ethylacetátu a petroletheru.

Krystalizací ze stejného rozpouštědla se získá 450 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-benzyloxykarbonyloxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

t. t. 98 až 99 °C, $[\alpha]_{578}^{18} = -14,0^{\circ}$ ($c = 0,58$, kyselina octová).

400 mg benzylesteru benzyloxykarbonyl-(2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-benzyloxykarbonyloxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu se rozpustí v 10 ml methanolu a hydrogenuje se 3 hodiny na 10 mg palladiové černi.

Katalyzátor se odfiltruje a rozpouštědlo se zahustí za sníženého tlaku. Jestliže se rekrystalizace provádí ve směsi methanolu a ethylacetátu, získá se 219 mg (2RS, 3RS)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

$[\alpha]_{578}^{30} = -8,8^{\circ}$ ($c = 0,90$, kyselina octová), $R_f = 0,48$ a $0,51$.

Pro $C_{16}H_{24}N_2O_5$

vypočteno: 59,24 % C, 7,46 % H, 8,64 % N;

nalezeno: 58,38 % C, 7,23 % H, 8,95 % N.

Srovnávací příklad 30

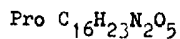
Benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanová kyselina, připravená z 1,05 g ze soli benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanové kyseliny s dicyklohexylaminem běžným způsobem použitím ethylacetátu a zředěné kyseliny sírové, 866 mg soli benzylesteru (S)-leucinu s kyselinou p-toluensulfonovou, 405 mg N-hydroxybenzotriazolu, 0,308 ml triethylaminu a 412 mg N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu nechá reagovat postupem podle srovnávacího příkladu 29.

V kvantitativním výtěžku se získá olejovitý benzylester benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

Jestliže se olejovitý benzylester benzyloxykarbonyl-(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu nechá reagovat způsobem popsaným ve srovnávacím příkladu

du 29, získá se 630 mg (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-p-hydroxyfenylbutanoyl-(S)-leucinu.

$$[\alpha]_{578}^{29} = -19,9^{\circ} \quad (c = 1,19, \text{ kyselina octová}), R_f = 0,48.$$



vypočteno: 60,55 % C, 7,30 % H, 10,08 % N;

nalezeno: 59,98 % C, 7,42 % H, 10,42 % N.

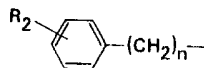
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby aminokyseliny obecného vzorce I



kde

R_1 je alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, cyklopentylmethyl, cyklohexylmethyl, cykloheptylmethyl nebo skupina vzorce



kde

R_2 je atom vodíku, chloru, methyl, nitroskupina, hydroxyl nebo aminoskupina a

n je 0 nebo 1,

vyznačený tím, že se nitril obecného vzorce III

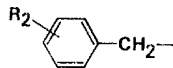


kde

R_1 má význam uvedený výše,

nebo derivát nitrilu s chráněnou aminoskupinou, hydrolyzuje kyselinou.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako výchozí sloučenina použije sloučenina obecného vzorce III, kde R_1 je skupina vzorce



kde

R_2 je atom vodíku, chloru, methyl, nitroskupina, hydroxyl nebo aminoskupina.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako výchozí sloučenina použije sloučenina obecného vzorce III, kde R_1 je benzyl.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako výchozí sloučenina použije sloučenina obecného vzorce III, kde R_1 je p-hydroxybenzyl.

OPRAVA

k PVP č. 201 034 (51) Int. Cl.³ C 07 C 101/04

Záhlaví —

místo: (21) (PV 3519-75)

správně: (21) (PV 3519-79)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
