



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

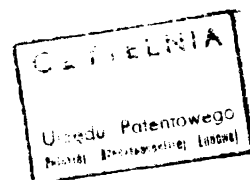
Zgłoszono: 84 10 16 (P. 250068)

Pierwszeństwo _____

Int. Cl.⁴ C07K 5/02

Zgłoszenie ogłoszono: 86 07 29

Opis patentowy opublikowano: 89 01 31



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 ogólnym przedstawionym na rysunku w którym R oznacza resztę 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 - fumaramoilo-L-2,3-diaminopropanoilo-L-alaninę, otrzymywany na drodze fermentacji. Antybiotyk ten wykazuje słabą aktywność biologiczną w stosunku do niektórych grzybów, natomiast nieznaczna jest jego aktywność przeciwko grzybom 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 oznacza resztę alaniny, metioniny, waliny, norwaliny, leucyny, norleucyny, kwasu α -aminomasłowego lub fenyloalaniny według wynalazku charakteryzuje się tym, 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 polarnego rozpuszczalnika organicznego lub jego mieszaniny z wodą, następnie z powstałego kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo - L-2,3-diaminopropanowego usuwa się grupą ochronną grupy aminowej i acyluje go estrem N-hydroksysukcynoimidowym tert-butoksykarbonylo-alaniny, -metioniny, -waliny, -norwaliny, -leucyny, -norleucyny, -leucyny, -norleucyny, -kwasu α -aminomasłowego lub fenoloalaniny, zaś po upływie 4-6 godzin uzyskany N-chroniony dipeptyd wydziela z mieszaniny poreakcyjnej, usuwa grupę ochronną grupy aminowej, zaś produkt końcowy w postaci chlorowodoru izoluje zwłaszcza przez

krystalizację i ewentualnie przeprowadza w wolny kwas. 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 za pomocą 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% glukozy, w temperaturze 30°C, czas odczytu 48 godzin. I tak między innymi stwierdzono, że minimalne stężenie hamujące /MIC/ dla dipeptydu, kwasu N²-t-metionylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego oznaczone wobec *Candida albicans* wynosi 0,1 µg/ml.

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 glukozominy, 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 - np. związki błonowo-czynne-makrolidy polienowe, inhibitory syntezy hitynowej - np. antybiotyk polioksyna, inhibitory biosyntezy eteroli - np. pochodne imidazolu jak katoconazole. Poza tym, znane związki działające na syntezę glukozaminową lecz niespecyficzne, działające również na inne enzymy - np. azaseryna, DON, itp. są silnie toksyczne.

Pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów oraz sposoby ich otrzymywania ilustrują podane niżej przykłady.

Przykład 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 węglanu sodu. Mieszaninę schładza się do 0°C i przy silnym mieszaniu dodaje 6,81 g/30 mM/ estru N-hydroksysukcynoimidowo-metylowego kwasu fumarowego. Reakcję prowadzi się przez 4 godziny, a po tym czasie metanol odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość zakwasza 1 N kwasem solnym do pH = 2. Uzyskany produkt kilkakrotnie ekstrahuje się octanem etylu, warstwę organiczną przemywa 30% roztworem chlorku sodu, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu, odparowuje rozpuszczalnik i krystalizuje z mieszaniny octanu etylu z heksanem. Otrzymuje się 7,2 g kwasu N² - t - butoksykarbonylo, N³ - 4 - metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 72÷74°C, co stanowi 76% wydajności teoretycznej. 3,16 g/10 mM/ kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego rozpuszcza się w 50 ml 4N chlorowodoru w dioksanie i pozostawia na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po czym odparowuje się rozpuszczalnik, pozostałość suszy w eksykatorze próżniowym i krystalizuje z mieszaniny metanol-eter etylowy. Otrzymuje się 2,6 g chlorowodorku kwasu N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 166-168°C, co stanowi 92% wydajności teoretycznej.

Do schłodzonego roztworu 1,43 g/5 mM/ estru N—hydroksysukcynoimidowego N-t-butoksykarbonylo-L-alaniny w 20 ml tetrahydrofuranu przy silnym mieszaniu dodaje się 0,7 ml trietyloaminy i 1,27 g/5 mM/ chlorowodorku kwasu N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego, rozpuszczonego w 5 ml wody. Całość miesza się przez 4 godziny i odparowuje rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszcza się w 10 ml wody dodaje 1 N kwasu solnego do pH = 2, a produkt reakcji kilkakrotnie ekstrahuje octanem etylu. Warstwę organiczną przemywa się wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Produkt krystalizuje się z mieszaniny octanem etylu-heksan. Otrzymuje się 1,55 g kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-alanylo, N³-4-metoksyfumarylo-2,3-diaminopropanowego o t.t 92-93°C, co stanowi 81% wydajności teoretycznej.

0,74 g/2 mM/ kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-alanylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego rozpuszcza się w 10 ml 4 N chlorowodoru w dioksanie i pozostawia na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po czym odparowuje się dioksan pod zmniejszonym ciśnie-

niem, a pozostałość krystalizuje z mieszaniny metanol-eter etylowy. Otrzymuje się 0,61 g chlorowodorku kwasu N²-L-alanylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 183-185°C, co stanowi 95% wydajności teoretycznej. Chlorowodorek rozpuszcza się w 10 ml wody i nanosi na kolumnę jonitową wypełnioną jonitem Dowox 1x2 w formie octanowej. Kolumnę płucze się wodą, a wyciek odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość krystalizuje z mieszaniny woda-metanol. Otrzymuje się wolny kwas N²-L-alanylo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowy. MIC = 6,3 µg/ml.

Analiza elementarna /Ala - FMOP/

C ₁₁ M ₁₈ N ₃ O ₆ Cl	obliczone	C40.80	H5.60	N12.98
	znalezione	C40.60	H5.46	N12,89

¹H NMR /D₂O/ = 1,28 /d, 3H, CH₃/ 3,68 /s, 3H, OCH₃/ 4.10-4.20 /m, 3H, CH-CH₂/ 4.52/, 14, CH/ 6.65-6.85 /m 2H, CH = CH/.

Przykład II. Do mieszaniny 0,5 g/2 mM/ chlorowodorku kwasu N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego i 0,7 ml /4 mM/ trietyloaminy w 20 ml metanolu dodaje się podczas mieszania 0.59 g/2 mM/ estru N-hydroksysukcynoimidowego N-t-butoksykarbonylo-L-metioniny w 20 ml metanolu. Całość miesza się przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, po czym odparowuje się metanol, pozostałość rozpuszcza w 10 ml wody, dodaje 1 N kwasu solnego do pH = 2, a produkt reakcji kilkakrotnie ekstrahuje octanem etylu. Warstwę organiczną przemywa się wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Produkt krystalizuje się z mieszaniny octan etylu-heksan. Otrzymuje się 0,68 g kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-metionilo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 90÷100°C, co stanowi 79% wydajności teoretycznej. 0,44 g/1 mM/kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-metionilo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego rozpuszcza się w 5 ml 4 N chlorowodorku w dioksanie i pozostawia na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizuje z mieszaniny metanol-eter etylowy. Otrzymuje się 0,36 g chlorowodorku kwasu N²-L-metionilo, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 172÷174°C, co stanowi 96% wydajności teoretycznej. MIC = 0,1 µg/ml.

Analiza elementarna /Met FMOP/

C ₁₃ H ₂₂ N ₃ O ₆ ClS	obliczone	C.40,67	H.5,77	N.10,94
	znalezione	C.40,56	H.5,67	N.10,81

¹H NMR /D₂O/ = 1,75 /m, 2H, CH₂/, 2,0/s, 3H, CH₃/ 2,45/m, 2H, CH₂/, 3,60/s, 3H, OCH₃/ 4,10-4,30/m, 3H, CH i CH₂/ 4,45/m, 1H, CH/ 6,68-6,80/m, 2H, CH = CH/.

Przykład III. Do schłodzonego do 0°C roztworu 1,11 g /5 mM/ chlorowodorku kwasu N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego i 0,42 g /5 mM/ kwaśnego węglanu sodu w 30 ml wody dodaje się przy silnym mieszaniu 1,57 g /5 mM/ estru N-hydroksysukcynoimidowego N-t-butoksykarbonylo-L-norwaliny w 20 ml tetrahydrofuranu. Całość miesza się w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej, po czym odparowuje się rozpuszczalnik, pozostałość rozpuszcza się w 20 ml wody, dodając 10% roztworu cytrynowego do pH = 2, zaś produkt reakcji kilkakrotnie ekstrahuje octanem etylu. Warstwę organiczną przemywa się wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu, a po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość krystalizuje z octanem etylu i heksanu. Otrzymuje się 1,7 g kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-norwalino, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 69÷70°C, co stanowi 83% wydajności teoretycznej. 0,83 g/2 mM/ kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-norwalino, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego rozpuszcza się w 10 ml 4 N chlorowodorku w dioksanie i pozostawia na 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizuje z mieszaniny metanol-eter etylowy. Otrzymuje się 0,65 g chlorowodorku kwasu N²-L-norwalino, N³-4-metoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego o t.t. 188÷190°C, co stanowi 93% wydajności teoretycznej. MIC = 0,1 µg/ml.

Analiza elementarna /Nva - FMOP/

C ₁₃ H ₂₂ N ₃ O ₆ Cl	obliczone	C.44,38	H.6,30	N.11,94
	znalezione	C.44.23	H.6,21	N.11,88

$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 0,95/\text{m}, 3\text{H}, \text{CH}_3/1,45-1,66/\text{m}, 4\text{H } 2 + \text{CH}_2/3,65/\text{s}, 3\text{H}, \text{OCH}_3/4,10-4,25/\text{m}, 3\text{H}, \text{CH i CH}_2/, 4,50/\text{g}, 14, \text{CH}/, 6,65-6,85/\text{m}, 2\text{H}, \text{CH} = \text{CH}.$

Przykłady IV-VII. Analogicznie jak w przykładzie I otrzymano następujące pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów, przedstawiono je w poniższej tabeli.

Przy- kład	Nazwa pochodnej	Jon masowy a/z	Analiza elementarna		
1	2	3	4		
IV	chlorowodorek kwasu N ² -L-walilo, N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3- diaminopropanowego	315	/Val-FM1P/ C ₁₃ H ₂₂ N ₃ O ₆ Cl	Obliczone	C.44,38 H.6,30 N.11,94
				Znalezione	C.44,31 H.6,19 N.11,82
			$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 1,20-1,45/\text{M}, 6\text{H}, 2, \text{CH}_3/2,90-3,00/\text{M}, 1\text{H}, \text{CH}/3,60/\text{S}, 3\text{H}-\text{OCH}_3/4,10-4,20/\text{M}, 3\text{H}, \text{CH i CH}_2/, 6,60-6,80/M, 3\text{H}, \text{CH} = \text{CH}/$		
V	chlorowodorek kwasu N ² -L-laucylo, N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3- diaminopropanowego	329	/Leu-FMDP/ C ₁₄ H ₂₄ N ₃ O ₆ Cl	Obliczone	C.45,96 H.6,61 N.11,48
				Znalezione	C.45,79 H.6,53 N.11,41
			$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 1,10-1,30/\text{M}, 6\text{H}, 2, \text{CH}_3/1,80-2,0/\text{M}, 2\text{H}, \text{CH}_2/2,70/\text{M}, 1\text{H}, \text{CH}/3,60/S, 3\text{H}, \text{OCH}_3/4,10-4,30/\text{m}, 3\text{H}, \text{CH i CH}_2/,4,50/\text{q}, 1\text{H}, \text{CH}/6,65-6,85/\text{M}, 2\text{H}, \text{CH} = \text{CH}/$		
VI	chlorowodorek kwasu N ² -l-norleucylo, N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3- diaminopropanowego	329	/Nva FMOP/ C ₁₄ H ₂₄ N ₃ O ₆ Cl	Obliczone	C.45,96 H.6,61 H.6,54
				Znalezione	C.45,88 H.6,54 N.11,39
			$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 0,90/\text{m}, 3\text{H}, \text{CH}_3/1,25-1,30//m, 2 + \text{CH}_3/1,55-1,85/\text{m}, 4\text{H}, 2\text{XCH}_2/3,65/S, 3\text{H}, \text{OH}_3/4,10-4,30/\text{m}, 3\text{H}, \text{OH i CH}_2/4,50/q, 1\text{H}, \text{CH}/6,65-6,80/\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}-\text{CH}/$		
VII	chlorowodorek kwasu N ² -L-2-aminobuta- noilo, N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3- diamino-301 propanowego	301	/Abu EMDP/ C ₁₂ H ₂₀ N ₃ O ₆ Cl	Obliczone	C.42,63 H.5,96 N.12,44
				Znalezione	C.42,52 H.5,88 N.12,36
			$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 1,25/\text{M}, 3\text{H}, \text{CH}_3/1,85-2,0//M, 2\text{H}_2, \text{CH}_2/3,60/\text{S}, 3\text{H}, \text{OCH}_3/4,10-4,25/\text{M}, 3\text{H}, \text{CH}/i \text{CH}_3/4,45/\text{q}, 1\text{H}, \text{CH}/6,60-6,85/\text{M}, 2\text{H}, \text{CH} = \text{CH}/$		
VIII	chlorowodorek kwasu N ² -L-fenylalanylo -N ³ -4-metoksyfumarylo-L-2,3-diamino- propanowego	363	/Phe FMDP/ C ₁₂ H ₂₂ N ₃ O ₆ Cl	Obliczone	C.51,06 H.5,55 N.10,51
				Znalezione	C.50,94 H.10,51 N.10,43
			$^1\text{H NMR}/\text{D}_2\text{O}/ = 3,45/\text{d}, 2\text{H}, \text{CH}_3/3,70/\text{s}, 3\text{H}/-\text{OCH}_3/3,60/\text{s}, 3\text{H}, \text{OCH}_3/, 4,15-4,30/\text{m}, 3\text{H}, \text{CH i}-\text{CH}_2/4,45/\text{q}, 1\text{H}, \text{CH}/6,60-6,80/\text{m}, 2\text{H}, \text{CH} = \text{CH}/,7,30-7,50/\text{m}, 4\text{H}, \text{aromatyczne}/$		

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania nowych pochodnych kwasu L-2,3-diaminopropanowego o strukturze dipeptydów o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, w którym R oznacza resztę alaniny,

metioniny, waliny, norwaliny, leucyny, norleucyny, kwasu α -aminomasłowego lub fenyloalaniny, **znamienny tym**, że monoester metylowy kwasu fumarowego aktywuje się N-hydroksysukcynoimidem i poddaje reakcji z solą sodową kwasu N²-t-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego w środowisku tetrahydrofuranu lub mieszaniny jednowodorotlenowego alkoholu alifatycznego o długości łańcucha C1÷C5 z wodą, następnie z powstałego kwasu N²-t-butoksykarbonylo, N³-4-alkoksyfumarylo-L-2,3-diaminopropanowego usuwa się grupę ochronną grupy aminowej i acyluje go estrem N-hydroksysukcynoimidowym tert-butoksykarboksylo-alaniny, -metioniny, -waliny, -norwaliny, -leucyny, -norleucyny, -kwasu α -aminomasłowego lub fenyloalaniny zaś po upływie 4÷6 godzin uzyskany N-chroniony dipeptyd wydziela z mieszaniny poreakcyjnej, usuwa grupę ochronną grupy aminowej, zaś produkt końcowy w postaci chlorowodoru izoluje zwłaszcza przez krystalizację i ewentualnie przeprowadza w wolny kwas.

