

209332

209332



FO. MAT. 1953

MALA FEPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

6 MAY. 1953

209282
209332

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de PARKE, DAVIS & COMPANY, entidad norteamericana,
establecida en Detroit, Michigan, Estados Unidos de América,
por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR COMPUESTOS DE AMINOACIDO"

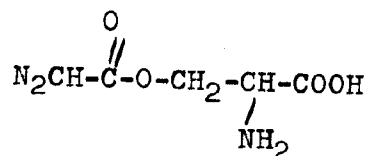
209332

Case 102



El presente invento se relaciona con un procedimiento para producir ciertos nuevos compuestos de amino ácido. Más en particular, el presente invento se relaciona con un procedimiento para producir nuevos compuestos de amino ácido derivados de la serina, es decir, O-diazoacetilserinas.

Las O-diazoacetilserinas, en particular la O-diazoacetil-l-serina y la O-diazoacetil-dl-serina, poseen propiedades terapéuticas muy singulares según aparecerá de la descripción siguiente. Dado que estos dos compuestos sólo se diferencian entre sí en sentido químico por el hecho de que uno de ellos es la forma isomérica ópticamente activa (l) y el otro es la forma ópticamente racémica de la O-diazoacetilserina, las propiedades químicas de ambos compuestos son idénticas como lo son también muchas de sus propiedades físicas. Ambos compuestos sólo contienen los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y poseen la fórmula empírica $C_5H_7N_3O_4$. Ambos tienen un peso molecular de 173,1 y pueden ser representados por la fórmula estructural



La O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina son relativamente inestables al calor, y se descomponen antes de fundirse. La descomposición no se produce a ninguna temperatura específica y por lo tanto los puntos de descomposición y de fusión varían dentro de un amplio orden, según el método utilizado para

209332



su determinación. Utilizando un aparato de Fisher-Johns para el punto de fusión, elevándose la temperatura según el régimen de 1°C por minuto, una muestra de cualquiera de ambos compuestos aplicada a la etapa próxima al punto de fusión, se comporta de la siguiente manera:

150 - 152°C	Comienza a ponerse castaña
155°C	Comienza a fundirse y se torna efervescente
158 - 159°C	Una masa derretida límpida con una ligera efervescencia

Cuando se utiliza un bloque de cobre elevando la temperatura en 1°C por minuto hallándose la muestra encerrada en un tubo capilar hermético los resultados que se obtienen son por lo general aproximadamente los siguientes:

146°C	Comienza a fundirse
150°C	Comienza a ponerse castaña
154°C	Totalmente castaña
158°C	Fuerte descomposición con desprendimiento de gas
162°C	Una masa derretida límpida con una ligera efervescencia

La O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina son descompuestas por un ácido acuoso con la liberación de 16,18% de nitrógeno. Bajo una hidrólisis ácida muy suave estos compuestos desprenden nitrógeno y la correspondiente O-glicolil serina. Una hidrólisis ácida más fuerte de estos compuestos produce nitrógeno, ácido glicólico y la correspondiente serina. Las curvas de liga-

209332



dura de hidrógeno muestran que $pK'a = 8,55$. Se produce otra desviación en las curvas de titulación en un pH de aproximadamente 4, pero ésta se debe probablemente a un fenómeno de descomposición.

Ambos productos son muy hidrosolubles pero son insolubles en los disolventes orgánicos no polares comunes. Sólo son muy escasamente solubles en metanol absoluto, etanol absoluto y acetona en frío pero son solubles en las soluciones acuosas calientes de estos disolventes. La O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina brindan resultados positivos con las pruebas de ninhidrina y sulfonato de naftoquinona para la determinación de alfa-amino ácidos. También dan resultados positivos con las pruebas de nitrato de plata amoniacal y acetato de cobre, lo que demuestra la presencia de un grupo reductor. En la prueba de Elson-Morgan se produce un color naranja atípico. Estos compuestos dan resultados negativos con los reactivos de Dische, Molisch, flóroglucinol de Tollen, resorcinol de Tollen, acetato de anilina, fucsinaldehida de Schiff y Pauly.

Los espectros de absorción de rayos ultravioletas de la O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina son idénticos. En un regulador acuoso del pH de fosfato a un pH de 7 se obtiene un pico característico de absorción de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1140$ con $\lambda_{\text{max.}} = 250,5 \text{ m}\mu$. En una solución 0,1 normal de hidróxido de sodio luego de 30 minutos se observa un pico de absorción de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1230$ con $\lambda_{\text{max.}} = 252$. En ácido clorhídrico 0,1 normal se observa una absorción escasa o nula. Esto se debe probablemente a la descomposición de estos productos bajo condiciones ácidas.

209332



La O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina forman sales de metales al reaccionar con hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, óxidos, alcoóxidos, amidas de metales alcalinos y metales alcalino-térreos, y otros productos similares.

Si bien es ópticamente activa, la O-diazoacetil-(l)-serina posee un poder rotatorio óptico muy escaso. Una solución acuosa al 8,46%, a un pH de 5,18, tiene una $[\alpha]_D^{27,5^\circ}$ de $-0,5^\circ$. La O-diazoacetil-(dl)-serina es ópticamente racémica, y por lo tanto carece de rotación óptica.

Las formas cristalinas de la O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina se diferencian entre sí. La O-diazoacetil-(l)-serina es un sólido cristalino de color amarillo verdoso claro mientras que la O-diazoacetil-(dl)-serina es un sólido cristalino amarillo claro bajo la luz normal. Bajo una luz polarizada plana este último producto es un sólido cristalino incoloro.

Los cristales de O-diazoacetil-(l)-serina son biaxilmente positivos con una birrefringencia moderadamente alta. La extinción es paralela en cristales y fragmentos de clivaje alargados. El compuesto se cristaliza probablemente en el sistema ortorrómbico. Los cristales y fragmentos de clivaje tienen una longitud fija, están alargados en forma paralela con la vibración beta y tienen un excelente clivaje plano paralelo al plano alfa-beta. Dado que los cristales tienden a posarse sobre esta superficie plana, sólo pueden medirse dos de sus índices. La medición de estos dos índices (alfa y beta) da los siguientes valores:

209332



$$\alpha = 1,523 \pm 0,002$$

$$\beta = 1,607 \pm 0,002$$

Los cristales de O-diazoacetil-(dl)-serina son biaxilmente positivos, el 2V es grande y la birrefringencia es extrema de modo que aún los fragmentos muy delgados dan un color blanco de orden muy alto bajo los prismas de Nicol cruzados. Debido a que algunas facetas de estos cristales se hallan tan desarrolladas que los cristales yacen sobre estas facetas y brindan una orientación preferida, una gran mayoría de los cristales dan figuras del eje óptico ligeramente a moderadamente descentradas. Los cristales pertenecen ya sea al sistema monoclinico o al triclinico. Los índices medidos, utilizando la luz de sodio ($\lambda = 5830\text{Å}$) son:

$$\alpha = 1,470 \pm 0,005$$

$$\beta = 1,564 \pm 0,002$$

$$\gamma = 1,744 \pm 0,006$$

Debido a que las estructuras de los cristales de la O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina son diferentes, también son diferentes sus espectros de absorción de rayos infrarrojos.

El espectro de absorción de rayos infrarrojos de la O-diazoacetil-(l)-serina, determinado al utilizar una mezcla en aceite mineral, compuesta por el material cristalino molido y un aceite mineral comercialmente conocido como Nujol, muestra los siguientes picos de absorción: 3,19, 3,81, 4,66, 5,89, 5,96, 6,22, 6,45, 6,63, 6,90, 7,15, 7,41, 7,57, 7,68, 7,85, 8,08, 8,42, 8,61,

2 0 9 3 3 2



1933

9,12, 9,70, 10,16, 10,32, 10,82, 11,16, 11,66, 11,83, 12,14, 13,26, 13,46, 13,60, y 13,78.

El espectro de absorción de rayos infrarrojos de la O-diazoacetil-(dl)-serina, determinado por el método precedentemente mencionado para el isómero óptico (l), tiene picos de absorción en los siguientes valores: 3,20, 3,68, 3,88, 3,99, 4,11, 4,68, 5,94, 6,26, 6,42, 6,68, 7,16, 7,38, 7,48, 7,64, 7,95, 8,44, 8,72, 9,14, 9,48, 9,88, 10,62, 10,87, 11,94, 12,30, 13,52, 13,86, y 14,67.

La O-diazoacetil-(l)-serina y la O-diazoacetil-(dl)-serina, como también sus sales de metales atóxicas, poseen propiedades terapéuticas singulares por el hecho de que ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de neoplasias en animales y seres humanos, y por esta causa son potencialmente muy valiosas para el tratamiento de estas enfermedades en los animales y los seres humanos. La O-diazoacetil-(dl)-serina sólo posee aproximadamente la mitad de la actividad biológica de la O-diazoacetil-(l)-serina en este sentido, indicando así que el isómero óptico d que contiene el racemato óptico es biológicamente inactivo. La inactividad biológica del isómero óptico d ha sido confirmada por la preparación y prueba de la O-diazoacetil-(d)-serina. El crecimiento de un tumor implantado en ratas es macroscópicamente inhibido por inyecciones diarias de O-diazoacetil-(l)-serina o O-diazoacetil-(dl)-serina. Las variedades de tumores que son afectados en esta forma incluyen el Sarcoma 180, linfosarcoma de Mecca, carcinoma de Ehrlich (forma líquida y sólida), carcinosarcoma 256 de Walker (ratas), sarcoma

209332

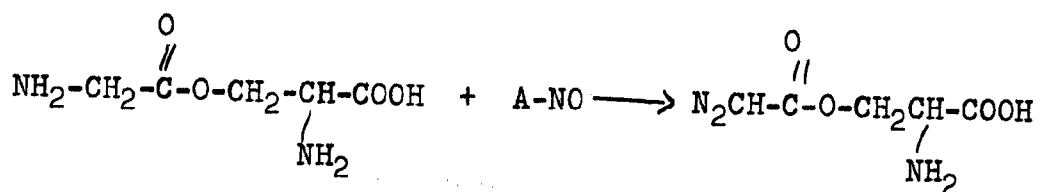


16 MAR

T241 de Lewis, linfosarcoma de Patterson, adenocarcinoma mamario EO771, sarcoma de ratas 39, carcinoma 63 de Bashford, adenocarcinoma de Miyono, adenocarcinoma mamario de Miyono, Sarcoma Ma 387, linfosarcoma de Gardner, epidermo-carcinoma, linfosarcoma de Murphy de las ratas y carcinoma de Flexner-Jobling de ratas. En los seres humanos, varios pacientes que sufrían de la anteriormente incurable enfermedad de Hodgkins han sido exitosamente tratados utilizando inyecciones parenterales de 10 mg/kg de peso corporal por día de O-diazoacetil-(l)-serina.

Se ha adoptado el nombre común o genérico de "azaserina" para la O-diazoacetil-(l)-serina.

De acuerdo con el presente invento, se produce O-diazoacetil-(l)-serina y O-diazoacetil-(dl)-serina haciendo reaccionar una sal de adición de ácido de los correspondientes isómeros (l) y (dl) de O-glicil serina con un agente diazotizante. La transformación que comprende la reacción puede quedar gráficamente representada de la siguiente manera



donde A representa HO-, alcoilo-O-, -SO₄ o halógeno.

Debe quedar entendido en estas fórmulas, como también en las demás fórmulas de compuestos capaces de existir en forma isomérica óptica que se mencionan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas que, en ausencia de una designa-

2 0 9 3 3 2



ción específica en sentido contrario, la fórmula sólo está destinada a representar el isómero óptico (l) o la forma ópticamente inactiva (dl) de los compuestos químicos. La misma convención, en ausencia de una designación en sentido contrario, debe ser aplicada a los nombres químicos de compuestos capaces de existir en forma isomérica óptica que aparecen en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas. Así, cuando un nombre químico no especifica cual es la forma óptica que se desea designar, el nombre debe ser interpretado en su sentido genérico limitado, es decir, como significando ya sea el isómero óptico (l) o la forma ópticamente racémica (dl).

Al llevar a cabo la conversión de O-glicil-(l)-serina y O-glicil-(dl)-serina en O-diazoacetil-(l)-serina y O-diazoacetil-(dl)-serina, respectivamente, se utiliza como el material inicial una sal de adición de ácido del compuesto de O-glicil serina y se mantiene la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de aproximadamente 30°C. El valor pH de la mezcla de reacción debe ser cuidadosamente regulado dentro del orden de 3,0 a 6,0 durante el procedimiento, a fin de obtener rendimientos satisfactorios de los productos deseados. Se obtienen los mejores resultados cuando se mantiene el pH de la mezcla de reacción entre 4,0 y 5,5. Con un pH mayor que aproximadamente 6 los materiales iniciales de O-glicil serina sufren una redistribución para formar la correspondiente N-glicil-serina, reduciendo así materialmente el rendimiento del producto deseado. Con un pH menor que aproximadamente 3,0 las

209332

181



deseadas O-diazoacetil serinas sufren una descomposición que también reduce el rendimiento y causa la contaminación del producto final. Como medio de reacción se prefiere el agua o las soluciones acuosas de disolventes orgánicos miscibles con agua, tales como alcoholes.

Pueden utilizarse numerosos agentes diazotizantes diferentes en el procedimiento. Por ejemplo, puede utilizarse el ácido nitroso, los alquil nitritos y los compuestos de nitrosilo. Cuando se utiliza el ácido nitroso como el agente diazotizante puede utilizarse una solución de ácido nitroso (preparada mediante la reacción de trióxido de nitrógeno con agua) o puede generarse el ácido nitroso in situ mediante la interacción de un ácido mineral y un nitrito inorgánico tales como los nitritos de metales alcalinos, los nitritos de metales alcalino-térreos y los nitritos de metales pesados. Algunos ejemplos específicos de estos nitritos inorgánicos son el nitrito de sodio, nitrito de potasio, nitrito de bario, nitrito de plata y otros similares. Dado que el compuesto de O-glicil serina que se utiliza como el material inicial se halla en la forma de una sal de adición de ácido, es por lo general preferible no agregar un ácido mineral a la mezcla de reacción sino dejar meramente que la sal de adición de ácido reaccione con el nitrito inorgánico para producir el ácido nitroso in situ. También puede producirse el ácido nitroso in situ haciendo burbujear trióxido de nitrógeno por la mezcla acuosa de reacción o utilizando la sal de ácido nítrico de la O-glicil

209332



serina y agregando una substancia reductora tal como ácido arsenioso a la mezcla de reacción. Algunos ejemplos de los alquil nitritos que pueden ser utilizados como agentes diazotizantes son el etil nitrito, butil nitrito y amil nitrito. Algunos ejemplos de los compuestos de nitrosilo que pueden ser utilizados en el procedimiento son el cloruro de nitrosilo, bromuro de nitrosilo y ácido nitrosil sulfúrico. La cantidad de agente diazotizante que se utiliza en el procedimiento no es particularmente crítica, pero por causas de economía debe utilizarse por lo menos un equivalente por cada equivalente del material inicial de O-glicil serina. Se obtienen los mejores resultados cuando se utiliza un exceso del agente diazotizante, y si bien sólo se desea diazotizar uno de los dos grupos amino que tiene el material inicial de O-glicil serina, puede utilizarse hasta tres a cuatro equivalentes del agente diazotizante sin ejercer un efecto perjudicial sobre el rendimiento del producto deseado.

El presente invento queda ilustrado mediante los siguientes ejemplos.

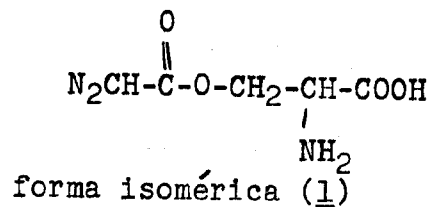
Ejemplo 1.

2,6 gramos de nitrito de sodio disueltos en 25 cm³ de agua son agregados a una solución de 2,9 gramos de monoclóridato de O-glicil-(1)-serina en 200 cm³ de agua, manteniendo la temperatura en 0°C. La solución es estacionada a una temperatura de 0 a 5°C durante 30 minutos y luego a la temperatura ambiente (de 20 a 30°C) durante 5 horas. La solución es congelada y el hielo es

209332



separado de la mezcla congelada por sublimación bajo alto vacío. El resultante producto sólido de color canela es disuelto en 40 cm³ de agua y vertido en una columna de adsorción que contiene 40 gramos de carbón activado (Darco) y 40 gramos de tierra de diatomas (Celite). La columna de adsorción es lavada con agua hasta que el líquido de salida mide aproximadamente 400 cm³. Este líquido es descartado y la columna es lavada con aproximadamente 200 cm³ de una solución acuosa que contiene 2% de acetona. La elución de acetona acuosa es recogida y evaporada al vacío hasta quedar seca para obtener la deseada O-diazoacetil-(1)-serina como un producto sólido de color amarillo-verdoso claro que tiene, en solución acuosa y a un pH de 7, un valor máximo de absorción de rayos ultravioletas de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1164$ en 250 m μ . El producto resultante, que tiene la siguiente fórmula



es químicamente puro pero, en caso deseado, se lo puede recrystallizar desde una mezcla compuesta por piridina, agua y etanol. El material recrystallizado tiene las propiedades químicas, físicas y biológicas especificadas en la descripción precedente. El valor máximo de absorción de rayos ultravioletas de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1164$ se diferencia del valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$ indicado en la descripción precedente por una cantidad que se halla dentro del error experimental permisible de valores máximos de absorción de esta magnitud.

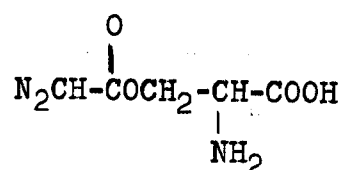
209332



1953

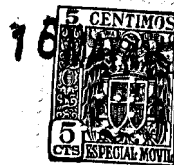
Ejemplo 2.

Se agregan 863 mg de nitrito de sodio disuelto en 20 cm³ de agua a una solución de 990 mg de monoclorhidrato de O-glicil-(dl)-serina en 30 cm³ de agua, manteniendo la temperatura en aproximadamente 0°C. La solución es estacionada durante 30 minutos a una temperatura de entre 0 y 5°C y luego se la congela y se separa el hielo de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo sólido es disuelto en 10 cm³ de agua y la solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 10 gramos de carbón activado y 10 gramos de tierra de diatomeas. La columna es lavada con agua hasta que se han recogido aproximadamente 120 cm³ del líquido de salida. Este líquido es descartado y se hace pasar por la columna un agua que contiene 2% de acetona hasta que el líquido de salida se torna incoloro. La elución de acetona acuosa es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener la deseada O-diazoacetil-(dl)-serina. Este producto, que tiene la siguiente fórmula

forma (dl)

es purificado por recristalización desde una mezcla de piridina, agua y etanol para formar un material que tiene un valor máximo de absorción de rayos ultravioletas de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$ a 250,5 mμ y un pH de 7. Las propiedades químicas, biológicas y otras propiedades

209332



físicas de la O-diazoacetil-(dl)-serina son iguales a las especificadas en la descripción precedente.

Ejemplo 3.

6,8 gramos de nitrito de plata son agregados con agitación a una solución de 8,8 gramos de monoclóridato de O-glicil-(dl)-serina en 440 cm³ de agua. La solución es agitada a la temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante cuatro minutos y luego se separa por filtración el cloruro de plata. El material filtrado es congelado, el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío y el residuo es disuelto en 100 cm³ de agua. La solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 100 gramos de carbón activado y 100 gramos de tierra de diatomeas y la columna es lavada con agua hasta que el volumen del líquido de salida es de aproximadamente 1,2 litros. El líquido de salida es descartado y se vierte agua que contiene 3% de acetona por la columna de adsorción hasta que el líquido de salida de acetona acuosa se torna incoloro. El líquido de salida de acetona acuosa es congelado y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo es recrystalizado desde una mezcla de piridina, etanol y agua para obtener la deseada O-diazoacetil-(dl)-serina en forma pura; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$ a 250,5 m μ y un pH de 7. Las propiedades químicas, biológicas y otras propiedades físicas del producto son las mismas especificadas en la descripción precedente.

209332



Ejemplo 4.

Aproximadamente 20 cm³ de una solución acuosa "standardizada" fría que contiene 1 gramo de ácido nitroso son agregados con agitación a una solución de 1 gramo de monoclóridato de O-glicil-(dl)-serina en 50 cm³ de agua, manteniendo la temperatura en 0°C. Durante la adición se ajusta el valor pH de la solución de modo que permanezca dentro del orden de 4 a 5,5. La mezcla de reacción es estacionada a 5°C durante 4 horas. La solución es congelada, el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo presión reducida y el residuo es disuelto en 25 a 30 cm³ de agua. La solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 25 gramos de carbón activado y 25 gramos de tierra de diatomeas y la columna es lavada con agua hasta que el volumen del líquido de salida es de aproximadamente 250 cm³. El líquido de salida es descartado y la columna es lavada con agua que contiene 3% de acetona hasta que el líquido de salida de acetona acuosa es incoloro. El líquido de salida de acetona acuosa es congelado y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener la deseada O-diazoacetil-(dl)-serina como un sólido de color amarillo-verdoso claro. Con la recristalización del producto de una mezcla de piridina, agua y etanol se obtiene el producto deseado en forma pura; $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = aproximadamente 1140 a 250,5 mμ. Las propiedades químicas, biológicas y otras propiedades físicas del producto son las mismas ya descritas en la descripción precedente.

209332



Ejemplo 5.

Se agrega 1 gramo de nitrito de amilo en 15 cm³ de etanol a una solución de 1 gramo de monoclorhidrato de O-glicil-(1)-serina en 50 cm³ de agua, manteniendo la temperatura próxima a los 0°C., El valor pH de la solución es ajustado a entre 4 y 5,5 con una solución diluída de hidróxido de sodio y la mezcla de reacción es agitada durante 4 horas a 5°C. La solución es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo es disuelto en 25 cm³ de agua y la solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 25 gramos de tierra de diatomeas y 25-gramos de carbón activado. La columna es lavada con agua hasta que el volumen del líquido de salida es de aproximadamente 250 cm³, y se descarta entonces este líquido de salida. La columna es lavada con agua que contiene 2% de acetona hasta que el líquido de salida es incoloro y el líquido de salida es congelado. El hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener un producto sólido cristalino de color amarillo-verdoso claro que es purificado por recristalización desde una mezcla de piridina, agua y etanol; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = aproximadamente 1140 a 250,5 m μ a un pH de 7. Este producto, que es O-diazoacetil-(1)-serina, tiene las mismas propiedades químicas, biológicas y físicas que han sido especificadas en la precedente descripción general.

209332



Ejemplo 6.

2 gramos de disulfato bruto de O-glicil-(dl)-serina $[\text{SO}_4\text{H}_2\cdot\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4]$ son disueltos en 50 cm^3 de agua y el pH de la solución es ajustado a 5 utilizando una solución al 5 % de hidróxido de sodio. El disulfato de O-glicil-(dl)-serina se convierte en el monosulfato por este procedimiento. El volumen de la solución es ajustado a 70 cm^3 y la solución es enfriada a una temperatura de 0 a 5° C . Se agrega en porciones y con agitación una solución fría de 1,17 gramos de nitrito de sodio en 130 cm^3 de agua, manteniendo la temperatura en la proximidad de 0° C . Se estaciona la mezcla de reacción a una temperatura de 0 a 5° C durante 30 minutos y luego a la temperatura ambiente (25° C) durante 4 horas y 30 minutos. La solución es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo es disuelto en 15 cm^3 de agua y la solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 11 gramos de carbon activado y 11 gramos de tierra de diatomeas. La columna es lavada con agua hasta que el volumen del líquido de salida es de aproximadamente 120 cm^3 . El líquido de salida es descartado y la columna es lavada con agua que contiene 2 % de acetona hasta que el líquido de elución es incoloro. La elución de acetona acuosa es evaporada al vacío hasta quedar seca y la O-diazoacetil-(dl)-serina residual es purificada por recristalización desde una mezcla de etanol y agua. Este material tiene un valor máximo

209332



de absorción de rayos ultravioletas de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = aproximadamente 1125 a 250 $m\mu$ y un pH de 7. Las propiedades químicas, biológicas y otras propiedades físicas del producto son las mismas ya especificadas en la descripción precedente para la O-diazoacetil-(dl)-serina.

Reemplazando en el procedimiento precedente el disulfato de O-glicil-(dl)-serina con monosulfato de O-glicil-(l)-serina $[\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot (\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4)_2]$, se obtiene O-diazoacetil-(l)-serina.

Ejemplo 7.

3,5 gramos de butil nitrito en 25 cm^3 de etanol frío son agregados con agitación a una solución de 3,5 gramos de monoclóridato de O-glicil-(l)-serina en 100 cm^3 de agua, manteniendo la temperatura en 0° C. El pH de la solución es ajustado a 3,5 y la solución es estacionada durante 4 horas a la temperatura ambiente. Durante este período se mantiene el pH de la solución entre 4,0 y 5,5. La mezcla de reacción es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo es disuelto en 40 cm^3 de agua y la solución es vertida por una columna de adsorción que contiene 40 gramos de carbón activado y 40 gramos de tierra de diatomeas. La columna es lavada con agua hasta que el volumen del líquido de salida es de aproximadamente 400 cm^3 y este líquido es descartado. Se lava entonces la columna con 200 cm^3 de agua que contiene 3 % de acetona y la elución de acetona acuosa es evaporada al vacío hasta quedar seca para obte-

209332



ner la deseada O-diazoacetil-(1)-serina como un producto sólido verde-amarillento claro que tiene un valor máximo de absorción de rayos ultravioletas en agua a un pH de 7 de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1160$ a $250 \text{ m}\mu$. Las propiedades químicas, biológicas y otras propiedades físicas de este producto son las mismas ya descritas en la precedente descripción general.

Ejemplo 8.

Una solución que consiste en 2,2 gramos de monoclóridato de O-glicil-(1)-serina en 100 cm^3 de agua es enfriada a 0°C y se introducen burbujas de vapores de trióxido de nitrógeno en la solución hasta que existe un gran exceso de ácido nitroso, indicado por un papel de yoduro de almidón. Se permite que la solución se caliente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se la estaciona a esta temperatura durante 5 horas. Durante este lapso se mantiene un pH de entre 3,5 y 5,0 y se agrega una mayor cantidad de trióxido de nitrógeno si la prueba con yoduro de almidón resulta negativa. El pH de la solución es ajustado a 6, la solución es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío. El residuo es disuelto en 40 cm^3 de agua y la solución es pasada por una columna de adsorción que contiene 40 gramos de tierra de diatomeas. La columna es lavada con agua hasta que el volumen de la elución es de aproximadamente 250 cm^3 , y se descarta esta elución. La columna es lavada con agua que contiene 2 % de acetona hasta

209332



que la elución se torna incolora y la elución es evaporada al vacío hasta quedar seca. El residuo, que consiste en O-diazoacetil-(1)-serina, es purificado por recristalización desde una mezcla de piridina, agua y etanol; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1164$ a 250 m μ y un pH de 7. Las características químicas, biológicas y otras características físicas del producto son iguales que las ya indicadas en la descripción precedente.

En lugar de utilizar el monoclórhidrato y el monosulfato en los ejemplos precedentes también puede utilizarse otras sales de adición de ácidos de las O-glicil serinas. Por ejemplo, puede utilizarse el monobromhidrato, monofluorhidrato, monofosfato y otras mono-sales similares. Las disales de las O-glicil serinas, es decir, los productos en los cuales ambos grupos amino se hallan en forma salina, no pueden ser utilizados en el procedimiento debido al limitado orden pH dentro del cual debe efectuarse la reacción de diazotización. Así, si se utiliza una di-sal como el material inicial se la neutraliza in situ para formar la mono-sal cuando se ajusta el valor pH de la mezcla de reacción de diazotización. Las expresiones "mono" y "di-", tal como se las utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, se refieren en la nomenclatura química a la cantidad de grupos amino que se hallan en forma salina. Así, el compuesto $\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot (\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4)_2$ recibe el nombre de monosulfato, mientras que el compuesto $\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot \text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ recibe el nombre de disulfato.

209332



En los ejemplos precedentes se describe el método utilizado para aislar O-diazoacetil-(l)-serina y O-diazoacetil-(dl)-serina en la forma de los ácidos libres. Estos compuestos también pueden ser aislados en las formas de sus sales de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos modificando ligeramente los procedimientos citados. Se logra este resultado agregando una solución acuosa que contiene un equivalente de un hidróxido, bicarbonato o carbonato de metal alcalino o alcalino-térreo a la elución de acetona acuosa antes de secarla por congelación. Las sales que se obtienen en esta forma son polvos hidrosolubles blancos. Estas sales también pueden ser obtenidas disolviendo una parte del ácido puro en agua y agregando una cantidad equivalente de una de las precedentemente citadas sustancias alcalinas. Por ejemplo, las sales de sodio, potasio y calcio pueden ser obtenidas de la siguiente manera.

Se disuelve 1,7 gramos de O-diazoacetil-(l)-serina en 30 cm³ de agua y se agrega una solución acuosa que contiene 0,84 gramos de bicarbonato de sodio. La solución límpida es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener la deseada sal sódica de O-diazoacetil-(l)-serina como un polvo blanco.

Se disuelve 1,7 gramos de O-diazoacetil-(dl)-serina en 30 cm³ de agua y se agrega una solución acuosa diluída que contiene 0,56 gramos de hidróxido de potasio. La solución

2 0 9 3 3 2



es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener la deseada sal de potasio de O-diazoacetil-(dl)-serina como un polvo blanco.

Se disuelve 1,7 gramos de O-diazoacetil-(l)-serina en 30 cm³ de agua y se agrega una solución acuosa que contiene 0,37 gramos de hidróxido de calcio. La solución es congelada y el hielo es separado de la masa congelada por sublimación bajo alto vacío para obtener la deseada sal de calcio de O-diazoacetil-(l)-serina como un polvo blanco.

Las sales de adición de ácidos de O-glicil serina que se utilizan como materiales iniciales en el procedimiento del presente invento pueden ser preparadas de numerosas maneras diferentes. Por ejemplo, las N-glicil serinas producidas según el método descrito por Fisher y otros en Ann. 375, 199 (1910) pueden ser redispuestas para formar las deseadas sales de adición de ácidos de O-glicil serina mediante el tratamiento con un ácido mineral bajo condiciones substancialmente anhidras a una temperatura de entre 0 y 100° C. En calidad de ácidos minerales pueden utilizarse el ácido sulfúrico al 100 %, ácido sulfúrico al 97 %, ácido fosfórico con consistencia de jarabe, ácido clorhídrico gaseoso, ácido bromhídrico gaseoso y otros similares. Las sales de adición de ácidos de O-glicil serina también pueden ser preparadas con derivados N-carbobenzoxílico de serina que pueden ser obtenidos mediante los métodos descritos en

2 0 9 3 3 2

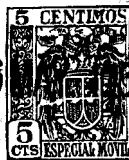


1953

Ber., 65, 1196 (1932) y J. Biol. Chem., 146, 463 (1942).
Cuando se utiliza un derivado N-carbobenzoxílico de serina como el material inicial puede hacerse reaccionar al derivado carbobenzoxílico con un halogenuro de haloacetilo o un anhídrido haloacético para producir el correspondiente compuesto de O-haloacetil-N-carbobenzoxi serina, hacer reaccionar a este compuesto halogenado con una azoimida de metal para producir el correspondiente compuesto de O-azoimidoacetil-N-carbobenzoxi serina y someter este último compuesto a la reducción bajo condiciones ácidas, eliminando así el grupo carbobenzoxilo y convirtiendo también el grupo azoimido en un grupo amino. Los derivados N-carbobenzoxílicos de serina también pueden ser convertidos en los deseados materiales iniciales haciendo reaccionar el derivado N-carbobenzoxílico de serina con un halogenuro de azoimidoacetilo para producir el correspondiente compuesto de O-azoimidoacetil-N-carbobenzoxi serina, el que es sometido entonces a la reducción bajo condiciones ácidas. Otro método comprende hacer reaccionar un derivado N-carbobenzoxílico de serina con un anhídrido mixto de carbobenzoxiglicina y someter el resultante compuesto de O-(N-carbobenzoxiglicil)-N-carbobenzoxi-serina a la reducción bajo condiciones ácidas. Aún otro método para producir los deseados materiales iniciales a partir de un derivado N-carbobenzoxílico de serina comprende hacer reaccionar el derivado N-carbobenzoxílico de serina con

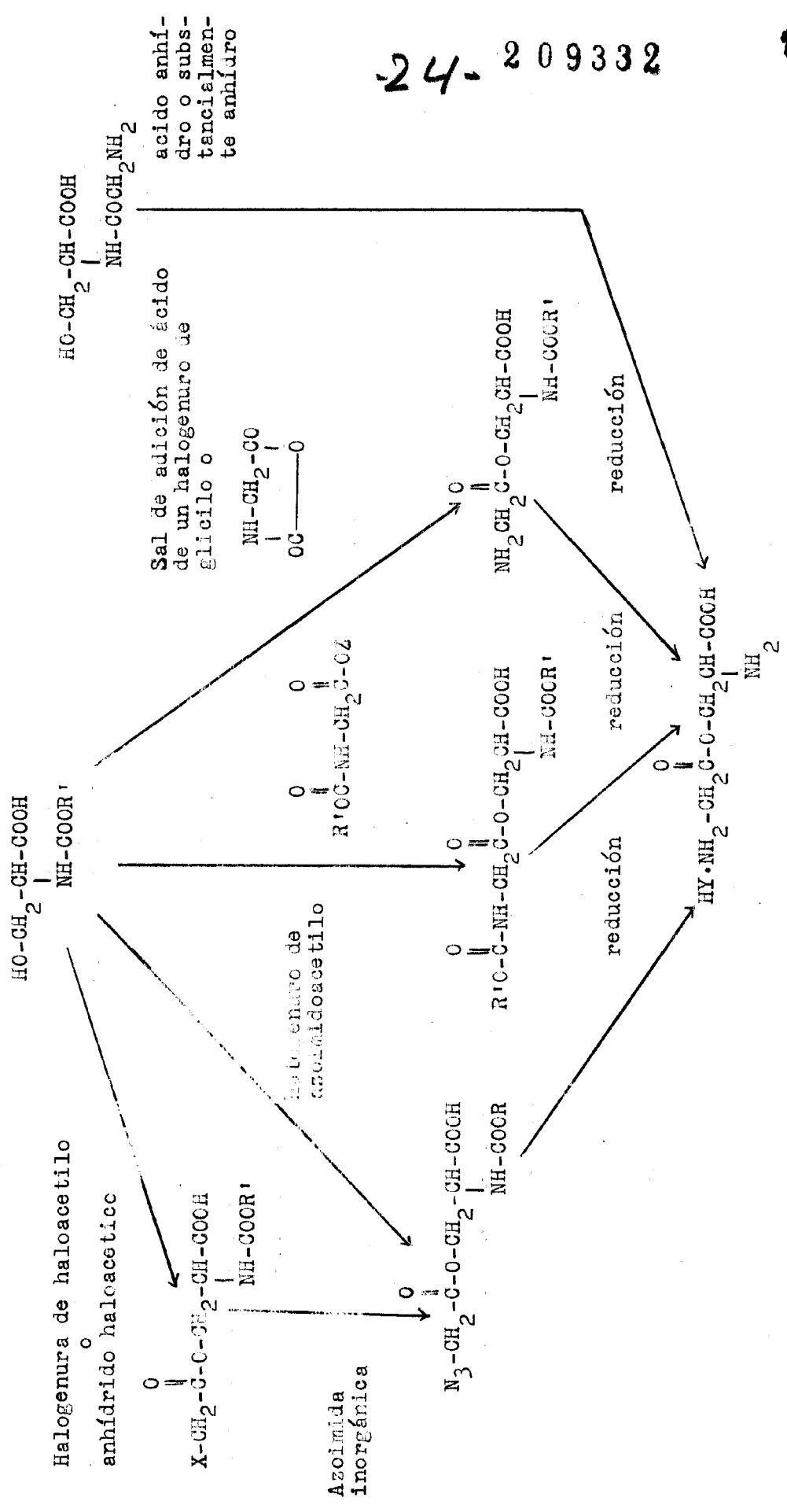
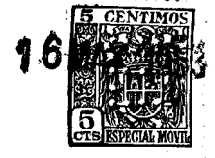
209332

16



un halogenuro de glicilo o un anhídrido de N-carboxiglicina para producir el correspondiente compuesto de O-glicil-N-carbobenzoxiserina y someter este último compuesto a la reducción bajo condiciones ácidas. Estos diversos métodos para producir las sales de adición de ácidos de O-glicil serina pueden ser esquemáticamente representados de la siguiente manera :

24-209332



209332



16M

donde R' representa un grupo bencilo tal como el radical bencilo mismo, radicales bencilo que contienen substituyentes anulares tales como los radicales alquilo, alcoxilo, carboxilo, halógeno, amino, nitro y otros radicales similares, radicales bencilo substituídos en la cadena lateral con grupos alquilo y fenilo y radicales bencilo substituídos tanto en la cadena lateral como en el anillo con los citados radicales substituyentes, HY representa un equivalente de un ácido mineral tal como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y sulfámico, X representa un átomo de halógeno y Z es una parte de un anhídrido mixto de un ácido que incluye carbonatos, fosfitos, arsenitos, fosfatos, sulfatos, alcanatoatos y ariloatos.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza del presente invento y la forma en que el mismo puede ser llevado a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo :

1. Un procedimiento para la producción de O-diazoacetil-(l)-serina u O-diazoacetil-(dl)-serina, que comprende hacer reaccionar una sal de adición de ácido de O-glicil-(l)-serina u O-glicil-(dl)-serina con un agente diazotizante.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la reacción es efectuada a una temperatura menor que aproximadamente 30° C en un medio de reacción acuoso que tiene un pH de entre 3 y 6.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el pH es de entre 4,0 y 5,5.
4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones precedentes, en el cual el agente diazotizante es ácido nitroso.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el ácido nitroso es generado in situ por la interacción de un ácido mineral y un nitrito inorgánico.
6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el cual el agente diazotizante es un alquil nitrito.

209332



1953

-27-

7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el cual el agente diazotizante es un compuesto de nitrosilo.

8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la sal de adición de ácido es un monoclorhidrato o un monosulfato.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual se hace reaccionar a la resultante O-diazoacetil-(l)-serina u O-diazoacetil-(dl)-serina con un hidróxido, carbonato, bicarbonato, óxido, alcóxido o amida de un metal alcalino o de un metal alcalino-térreo para producir una sal de metal de O-diazoacetil-(l)-serina u O-diazoacetil-(dl)-serina.

10. Un procedimiento para producir compuestos de aminoácido.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 18 JUL 1953

F. A.
Alberto de Elzaburu
Por Elzaburu