

27. Synthèse de deux nouveaux acides amines phénoliques comportant un cycle 1,2,4-oxadiazole¹⁾

par Claude Moussebois, Joseph F. Heremans†, Robert Merenyi et Walthère Rennerts

Unité de Médecine Expérimentale, Institut de Pathologie Cellulaire,
Université Catholique de Louvain, 1200 Bruxelles (Belgique)

(25. X. 76)

Synthesis of two phenolic amino acids containing the 1,2,4-oxadiazole ring

Summary

The synthesis of α -amino- β [3-(*p*-hydroxyphenyl)-1,2,4, oxadiazol-5-yl]propionic acid (**9**) and its β -amino isomer (**10**) (see *scheme 3*) is reported. By condensation of *p*-benzyloxy-benzamide oxime and N-benzyloxycarbonyl asparagine the derivatives **4** and **5** (see *scheme 1*) are obtained leading after deprotection to **9** and **10**. The synthesis of N-carboxyanhydride of **4** (**6**) and its corresponding amino acid (**7**) and amide (**8**) is also described.

Une des deux substances (**9**) dont la synthèse est décrite dans le présent article semble résulter de l'introduction d'un cycle oxadiazole entre le groupe *p*-hydroxy-phényl et le groupe méthylène d'une tyrosine. La seconde substance (**10**) représente un isomère β -aminé et constitue le produit secondaire de la réaction. Cette synthèse a été entreprise dans le but d'obtenir un composé voisin de la tyrosine, plus hydro-soluble que celle-ci à pH 7 et susceptible d'être conjugué à des protéines.

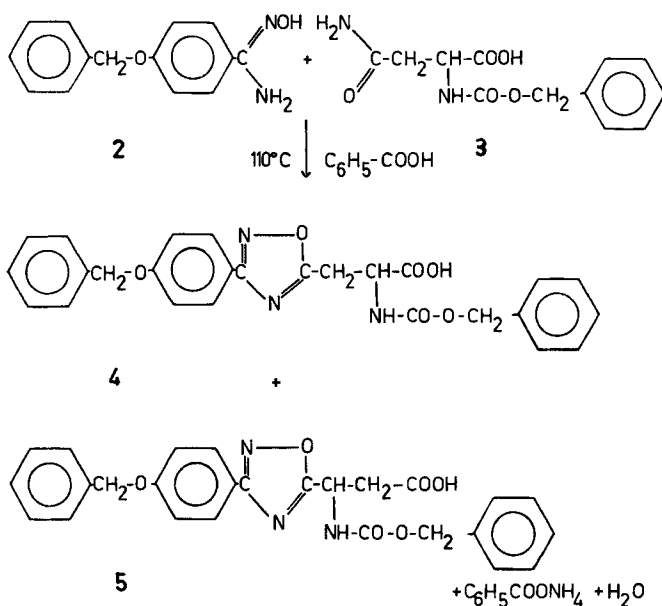
L'obtention de dérivés de l'oxadiazole-1,2,4 a été réalisée par la méthode de condensation d'une amidoxime avec une amide [1]. Pour permettre l'utilisation d'amides dérivées d'acides aminés, cette méthode a dû, cependant, être modifiée par l'emploi de solvant [2] ou d'acide benzoïque agissant comme milieu de réaction et comme capteur d'ammoniaque.

Dans ces conditions la condensation peut s'effectuer à 110° seulement (*schéma 1*), après avoir au préalable nécessairement protégé le groupe α -aminé de l'asparagine et le groupe phénolique de l'amidoxime par des substituants clivables [3]. L'amidoxime est préparée selon *Tiemann* [4].

Les deux dérivés **4** et **5** isolés après réaction sont différenciés par comparaison de leur spectre RMN. avec celui des substances constitutives **2** et **3**. En ce qui concerne les protons aromatiques il n'y a pas de modification significative de leur déplacement

¹⁾ Communication présentée à l'assemblée générale de la Société Suisse de Chimie à Genève, le 9 octobre 1976.

Schéma 1

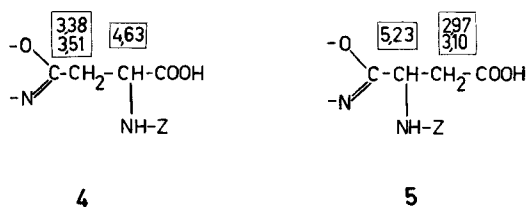


chimique après condensation. Il en va de même en ce qui concerne les groupes méthylène des séries benzyloxy et benzyloxycarbonyle. Par contre les déplacements chimique des trois protons situés sur les deux atomes de carbone les plus proches du C(5) de l'oxadiazole sont très différents de ce qu'ils étaient dans l'asparagine.

Précédemment, nous avons démontré le caractère électropositif marqué des deux atomes de carbone de l'oxadiazole-1,2,4 et plus particulièrement du C(5) [5]. On peut s'attendre à ce que les protons situés sur l'atome de carbone adjacent au C(5) soient fortement déblindés. En comparant les déplacements chimiques des groupes méthyle du phényl-3-méthyl-5-oxadiazole-1,2,4 ($\delta = 2,88$ ppm) et de l'acide acétique ($\delta = 2,10$ ppm) pris comme référence imparfaite, on note un effet marqué.

Les deux isomères **4** et **5** peuvent être distingués par le fait que les déplacements chimiques des protons immédiatement voisins du C(5) de l'oxadiazole ont une valeur δ de 0,4 à 0,6 ppm plus élevée que ceux des groupes correspondants voisins du groupe carbonyle.

Schéma 2



Sur base de ces deux preuves complémentaires, on attribue les structures acide α -aminé à **4** et acide β -aminé à **5**.

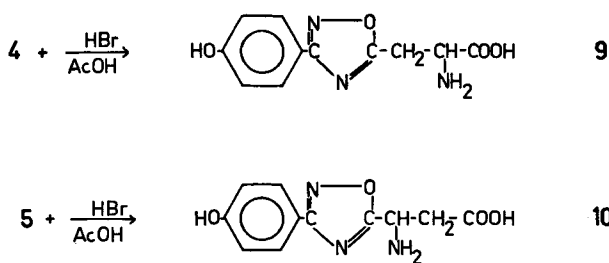
Les deux protons diastéréotopiques du groupe méthylène (A,B) et le proton du groupe $>\text{CH}-$ (X) apparaissent dans le spectre comme un système ABX (X étant couplé en plus avec NH) dont les constantes de couplage calculées sont les suivantes:

Constantes de couplage (en Hz)				
	$J_{A,B}$	$J_{A,X}$	$J_{B,X}$	$J_{X,NH}$
4	15,6	5,5	9,1	8
5	16,6	6,6	7,4	7,6

En plus des preuves physiques de leur identité les dérivés **4** et **5** peuvent également être différenciés chimiquement par leur comportement à l'égard de PCl_5 . On ne peut obtenir ainsi le N-carboxyanhydride **6** qu'à partir du dérivé α -aminé **4**. Dans les mêmes conditions, le dérivé β -aminé **5** ne réagit pas. Par action de l'eau sur **6** on obtient l'acide α -aminé correspondant **7** et par action de la 2-méthoxy-éthylamine l'amide α -aminée correspondante **8**.

En examinant les rapports des quantités d'isomères acides α - et β -aminés obtenus, on s'aperçoit que la réaction produit deux fois plus de dérivé β - que de dérivé α -aminé. Tout se passe comme si l'acylation de l'amidoxime se réalisait tout aussi bien, et même mieux, à partir de la fonction acide carboxylique qu'à partir de la fonction amide de l'asparagine. Cependant il y a trois objections à cette hypothèse: 1) lors de la réaction d'une amidoxime aromatique avec une amide, en présence d'un acide carboxylique ne correspondant pas à cette amide, le pourcentage d'oxadiazole obtenu par l'action de l'acide est, toujours faible (quelques%) vis-à-vis du pourcentage d'oxadiazole obtenu à partir de l'amide [2]; 2) si l'on admet l'hypothèse avancée la substance **5** devrait être une amide et non un acide comme c'est le cas; 3) lorsque, toutes les conditions restant semblables, on effectue la réaction de condensation en remplaçant l'asparagine N-substituée par l'acide aspartique N-substitué on obtient effectivement un mélange de dérivé α - et β -aminé mais en quantité infiniment moindre (10 à 15% des rendements obtenus à partir de l'asparagine N-substituée). De plus, on note dans ces conditions une décomposition marquée des réactifs engagés. On voit que tout conduit à rejeter la première hypothèse.

Schéma 3



On peut supposer qu'il se forme transitoirement, au cours de la réaction, une forme activée (éventuellement cyclique) de l'asparagine N-substituée. Aucun composé intermédiaire n'ayant été isolé, rien ne vient renforcer cette deuxième hypothèse.

Les acides α -amino- β -[3-(*p*-hydroxyphényl)-1,2,4-oxadiazolyl]propionique (**9**) et β -amino- β -[3-(*p*-hydroxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propionique (**10**) sont obtenus par action de l'acide bromhydrique exercée respectivement sur **4** et sur **5** (schéma 3).

L'utilisation de l'hydrogène comme moyen de déprotection de **4** et de **5** n'a pas été retenue afin d'éviter une réduction simultanée du cycle oxadiazole.

Examinés en électrophorèse sur papier à pH 6,5, **9** et **10** se comportent tous deux comme des acides aminés neutres et ne migrent pas. Seule la coloration qu'ils acquièrent par réaction avec la ninhydrine permet de les différencier: pour **9** elle est jaune ocre, pour **10** elle est bleue. A pH 1,9 l'acide β -aminé **10** migre nettement plus vite que l'acide α -aminé **9**.

Ces deux nouveaux acides aminés que l'on peut obtenir à partir d'une réaction simple, ainsi qu'il vient d'être démontré, sont tous deux à pH neutre nettement plus solubles dans l'eau, (6 mg/ml, 20°) que la tyrosine (0,4 mg/ml, 20°).

9 et **10** sont également solubles dans des solvants organiques tels que AcOH, méthanol, propanol-2, dioxane.

Nous remercions le *Fonds de la Recherche Cancérologique de la Caisse Générale d'Epargne et de Retraite* pour son aide financière. Notre gratitude va également à Madame F. Ghigny pour sa collaboration et à Monsieur M. Liénart pour son aide technique.

Partie expérimentale

Abréviations: CCM: chromatographie sur couche mince; Rdt.: rendement; AcOH: acide acétique; EtOAc: acétate d'éthyle; ϵ : coefficient d'extinction molaire.

Les spectres IR. ont été obtenus sur un spectrophotomètre *Perkin-Elmer* 457, l'indice *s* se rapporte aux bandes fortes; les spectres UV. ont été obtenus sur un spectrophotomètre *Beckman* DB-G; les spectres ¹H-RMN. ont été mesurés sur un appareil *Varian* XL-100 (solvant: diméthylsulfoxyde deutéré; les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm et sont suivis de la multiplicité du nombre d'atomes d'H intégrés et de l'interprétation. Abréviations: *s* = singulet, *d* = doublet, *m* = multiplet). Les F. ont été mesurés au moyen du microscope à point de fusion *Gallenkamp*; les analyses élémentaires ont été effectuées après séchage à poids constant sous 0,01 Torr; les CCM. ont été réalisées sur plaques de SiO₂ *Merck* F254.

Les solvants de développement ou d'élution (composition en volume) = *S*: *S*₁: cyclohexane/2-propanol 1:1; *S*₂: cyclohexane/chloroforme/alcool *t*-butylique/AcOH 10:6:3:1; *S*₃: cyclohexane/2-propanol/méthanol 2:1:1; *S*₄: cyclohexane/2-propanol/méthanol 4:3:3. Les électrophorèses à haut voltage (EHV.) ont été réalisées sur papier *Whatman* 3MM à pH 1,9 et 6,5 et à 60 V/cm pendant 1 h; La migration du N- ϵ -DNP Lys est utilisée comme référence. Le rapport des migrations $x/N\text{-}\epsilon\text{-DNP-Lys}$ est symbolisé par EHV. relative de *x*.

1. *p*-Benzyloxybenzonitrile (**1**). On ajoute à la solution de 50 g de *p*-hydroxybenzonitrile (0,42 mol) dans 400 ml d'éthanol successivement 16,8 g de NaOH (0,42 mol) dissous dans 200 ml d'eau distillée et 71,8 g de bromure de benzyle (0,42 mol). La solution est maintenue sous bonne agitation pendant 8 à 10 h à 25°. Le précipité cristallin apparu est essoré, lavé à l'eau et séché sous vide; on recueille 76,5 g (87%) de **1**. F. 98°. – RMN.: 5,20 (*s*, 2H, méthylène benzylique).

C₁₄H₁₁NO (209,25) Calc. C 80,36 H 5,30 N 6,69% Tr. C 80,22 H 5,29 N 6,55%

2. *p*-Benzyloxybenzamide-oxime (**2**). 41,8 g de **1** (0,2 mol) sont introduits dans un ballon de 500 ml et agités pendant 15 min. dans 150 ml de benzène; on introduit ensuite dans le ballon 125 ml de méthanol pour achever la mise en solution de **1**. Enfin on ajoute 180 ml d'une solution méthanolique contenant 0,25 mol d'hydroxylamine libre. La réaction se poursuit pendant 2 jours à 25° dans

le ballon bien clos. Des cristaux apparaissent et par décantation on sépare 18 g de 2. Les eaux-mères sont placées à 4° pendant 24 h et fournissent encore 11 g de 2. Les filtrats sont évaporés et repris par 100 ml de benzène; on récupère ainsi en solution dans le benzène 7 g de 1 et sous forme d'insoluble 7 g de 2. Rdt. en 2: 89%. F: 168°

$C_{14}H_{14}N_2O_2$ (242,28) Calc. C 69,40 H 5,82 N 11,56% Tr. C 69,34 H 5,75 N 11,71%

3. α -N-benzyloxycarbonyl-D, L-asparagine (3). A 1,5 l d'une solution aqueuse contenant 15 g de NaOH et agitée vigoureusement grâce au vibreur on ajoute successivement 123 g de DL-asparagine monohydrate (0,82 m) puis 150 g de $NaHCO_3$. Après 1 h la plus grande partie de l'asparagine s'est dissoute et on ajoute, goutte à goutte, 168 g de chloroformiate de benzyle (1 mol). Une vive agitation est maintenue pendant 6 à 8 h. Le milieu réactionnel est extrait par 4 × 300 ml d'éther; la solution aqueuse est filtrée puis acidifiée à pH 3. Le précipité volumineux ainsi obtenu est lavé à l'eau distillée puis séché sous vide. On obtient 169 g (77%) de 3. F. 156°. – RMN.: 5,08 (s, 2H, méthylène benzylique).

$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266,26) Calc.: C 54,13 H 5,30% Tr. C 54,20 H 5,24%

4. Acide α -benzyloxycarbonylamino- β -[3-(p-benzyloxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionique (4) et acide β -benzyloxycarbonylamino- β -[3-(p-benzyloxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionique (5). – 4.1. On introduit dans un ballon de 500 ml un mélange homogène comprenant 9,7 g de 2 (0,04 mol) 10,65 g de 3 (0,04 mol) et 40 g d'acide benzoïque. Placé pendant 50 min dans un bain d'huile, thermostaté à 110°, ce mélange entre progressivement en fusion et est maintenu sous agitation. Il est ensuite additionné de 200 ml de EtOAc. La solution refroidie à 25° est débarrassée, par filtration, du précipité de benzoate d'ammonium et le filtrat est conservé 24 h à 4°. Après ce laps de temps 6 g de cristaux A formés sont recueillis sur papier filtre et lavés avec 10 ml de EtOAc. Après avoir subi le traitement exposé ci-après (cf. 4.2) les cristaux A vont fournir 2 g de 4. Les filtrats B qui les accompagnent vont fournir 4 g de 5 (cf. 4.3).

4.2. 6 g de cristaux A (voir 4.1) finement broyés sont mis en suspension dans 200 ml d'une solution aqueuse maintenue à pH 8,5. Après 15 min. de contact, on sépare par filtration un résidu insoluble d'un filtrat composé de produits de dégradation. Le résidu est mis en suspension pendant 10 min. dans 50 ml d'une solution aqueuse de NaOH 1N; on sépare par filtration un second résidu insoluble composé de 1,2 g de 2 et un second filtrat. L'acidification de ce dernier filtrat, effectuée à pH 3, entraîne la précipitation de 2 g de 4. On recristallise 4 dans un mélange benzène/EtOAc 9:1 F. 138°–139°. Rdt. calculé pour 6,4 g de 2: 16%. Rf de 4 en CCM. avec S_2 : 0,45. – IR. (KBr.): 3380, 1722s, 1710s, 1682s, 1608, 1508s, 1413, 1380s, 1175, 1021, 1000, 970, 832, 750, 698 cm^{-1} . Log ϵ (2620 Å): 4,25 (dans le dioxane). – RMN.: 3,38 et 3,51 (2H–C(5) de l'oxadiazole); 4,63 (m, 1H, H–C(β)); 5,05 (s, 2H, CH_2 (du groupe benzyloxycarbonyl)); 5,20 (s, 2H, O– CH_2 du groupe benzyloxyphényle); 7,20 (d, 2H, 2H en position ortho de l'atome d'oxygène du groupe benzyloxyphényle); 7,25–7,45 (m, 10H, 2 × C_6H_5); 7,94 (m, 3H, 2H en position méta par rapport à l'atome d'oxygène du groupe benzyloxyphényle et 1H du groupe NH).

$C_{26}H_{23}N_3O_6$ (473,49) Calc. C 65,95 H 4,90 N 8,87% Tr. C 66,04 H 4,94 N 8,99%

4.3. Les filtrats B sont évaporés à sec et l'acide benzoïque qu'ils renferment est extrait par du cyclohexane chauffé à 70°. Les résidus de cette opération sont traités par le méthanol à 50°. Après refroidissement on isole encore 0,1 à 0,2 g de cristaux de 4. Ensuite, sur une colonne de silicagel (hauteur 60 cm, diamètre 30 mm) on effectue une chromatographie liquide d'une fraction des filtrats B représentant 0,5 g de résidus traités. Une première élution par 800 ml de S_1 élimine 0,11 g de 2 et des produits de dégradation. Une seconde élution par 600 ml de S_2 fournit 0,22 g de 5. On recristallise 5 dans un mélange cyclohexane/benzène/EtOAc 20:9:1. F. 134–135°. Rdt. calculé pour 6,4 g de 2: 32%. Rf de 5 en CCM. avec S_2 : 0,68. – IR. (KBr.): 3340, 1721s, 1610, 1540, 1425, 1281, 1252s, 1180, 1045, 910, 840, 750, 740, 698 cm^{-1} . Log ϵ (2620 Å): 4,29 (dans le dioxane). – RMN.: 2,97 et 3,10, 2H–C(α); 5,09 (s, 2H, CH_2 du groupe benzyloxycarbonyl); 5,20 (s, 2H, Ph– CH_2 –O–); 5,23 (m, 1H, H–C(5) de l'oxadiazole); 7,20 (d, 2H, 2H en position ortho par rapport à l'atome d'O du groupe benzyloxyphényle); 7,3–7,5 (m, 10H, 2 × C_6H_5); 7,92 (d, 2H, 2H en position méta par rapport à l'atome d'O du groupe benzyloxyphényle); 8,24 (1H, NH).

$C_{26}H_{23}N_3O_6$ (473,49) Calc. C 65,95 H 4,90 N 8,87 Tr. C 65,80 H 4,76 N 8,82%

5. N-carboxyanhydride de l'acide α -amino- β -[3-p-benzyloxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propionique (6). A 0,2 g de 4 finement broyé et en suspension dans 15 ml de benzène on ajoute, sous

agitation et à l'abri de l'humidité 0,1 g de PCl_5 . Après 5 min. les réactifs sont dissous et on évapore le benzène et POCl_3 sous 20 Torr. Le résidu est lavé par 2×2 ml d'éther anhydre. Rdt. 80%. On recrystallise **6** dans un mélange cyclohexane/ether 5:1. F. 186° (déc.). – IR. (KBr): 3290, 1860, 1775 s, 1760 s, 1610, 1590, 1482, 1450, 1420, 1380, 1360, 1258 s, 1177, 1105, 1028, 950, 921 s, 840, 760, 740 cm^{-1} .

$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$ (365,35) Calc. C 62,46 H 4,14 N 11,50% Tr. C 62,16 H 4,28 N 11,32%

6. Chlorhydrate de l'acide α -amino- β -[3-p-benzyloxyphényle]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propionique (**7**). Dans 10 ml de dioxane on met en solution 0,1 g de **6** puis on ajoute 0,5 ml d'eau. Le mélange est évaporé sous 20 Torr fournissant **7** comme résidu. On recrystallise **7** d'un mélange dioxane/eau 10:1 F. 226° (déc.). – IR. (KBr): 1725 s, 1605, 1570, 1485 s, 1425, 1250 s, 1228 s, 1175, 1012, 840, 752 cm^{-1} .

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_4$ (375,81) Calc. C 57,52 H 4,83% Tr. C 57,41 H 4,91%

7. α -Amino- β -[3-(p-benzyloxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-N-(2-méthoxyéthyl)propionamide (**8**). A 0,2 g de 2-méthoxy-éthylamine solubilisé dans 2 ml de dioxane on ajoute en une fois 0,3 g de **6** solubilisé dans 5 ml de dioxane. Après 15 min. à 25° les produits volatils sont évaporés sous 20 Torr. Le résidu est purifié sur colonne de silicagel (hauteur 70 cm, diamètre 20 mm) par élution dans S_3 . La détection se fait à 2540 Å. On élimine une impureté avec les premiers 100 ml d'éluat et on recueille 0,23 g de **8** dans les 400 ml suivants. Rdt. 70%. On recrystallise **8** d'un mélange cyclohexane/benzène 6:1, F. 68° . Rf de **8** en CCM. avec S_4 : 0,60 (coloration jaune avec la ninhydrine). – IR. (KBr): 3390, 3310, 1640 s, 1610, 1590, 1570, 1520 s, 1420, 1365 s, 1255 s, 1175, 1125 s, 1025, 905, 838, 755, 735, 695 cm^{-1} .

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$ (396,45) Calc. C 63,62 H 6,10% Tr. C 63,75 H 6,02%

8. Bromhydrate de l'acide α -amino- β -[3-(p-hydroxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propionique monohydraté (**9**). On dissout 0,1 g de **4** dans 2,5 ml d'AcOH anhydre, on ajoute à cette solution 5 ml d'AcOH à 40% d'HBr. Après 30 min. de contact à 25° la solution est évaporée sous 0,1 Torr, le résidu est lavé par 2×5 ml d'éther anhydre puis séché sous vide. F. 195° (déc.). – IR. (KBr): 1700 s, 1610, 1590, 1482 s, 1430, 1350, 1330, 1280, 1255, 1220 s, 1175, 900, 850, 750, 710 cm^{-1} . Log ϵ (2620 Å): 4,05 (dans l'eau à pH 5,5). EHV. relative de **9**: 0,64 à pH 1,9. La révélation du papier effectuée à la ninhydrine produit un spot jaune ocre.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_5$ (348,16) Calc. C 37,94 H 4,05 N 12,07% Tr. C 38,09 H 3,97 N 12,06%

9. Bromhydrate de l'acide β -amino- β -[3-(p-hydroxyphényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propionique monohydraté (**10**). Le mode opératoire est celui de **9**. F. 190 – 195° (déc.). – IR. (KBr): 1720 s, 1600 s, 1480 s, 1430, 1350, 1192 s, 1130, 900, 840, 780, 745, 642 cm^{-1} . Log ϵ (2620 Å): 4,11 (dans l'eau à pH 5,5). – EHV. relative de **10**: 1,40 à pH 1,9 (spot bleu).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_5$ (348,16) Calc. C 37,94 H 4,05 N 12,07% Tr. C 37,90 H 3,83 N 11,96%

10. Hydrolyse de **9** et de **10**. L'hydrolyse acide réalisée par chauffage de 18 h à 110° dans HCl 6N entraîne la dégradation complète de **9** et de **10**. Pour **9** on récupère 60% de l'acide aspartique isolable, pour **10**: 100%. L'hydrolyse basique réalisée par chauffage de 2 h à 90° dans NaOH 2N entraîne également la dégradation de **9** et de **10**. Pour **9** on récupère 50% de l'acide aspartique isolable, pour **10** aucune trace d'acide aminé. Il faut noter que **9** peut être chauffé à 100° dans HCl 2N pendant 2 h sans altération.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. Moussebois, Bull. Soc. chim. Belges 76, 92 (1967).
- [2] A. Meeus, Mémoire non publié, Université Catholique de Louvain, juillet 1972.
- [3] K. Okawa, Bull. Soc. chim. Japan 30, 976 (1957).
- [4] F. Tiemann, Ber. deutsch. chem. Ges. 17, 126 (1884).
- [5] C. Moussebois & F. Eloy, Helv. 47, 838 (1964).