



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00834**

(22) Data de depozit: **19.10.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2012** BOPI nr. **8/2012**

(41) Data publicării cererii:
29.04.2011 BOPI nr. **4/2011**

(73) Titular:
• **BACĂREA PETRUȘ FĂNEL,**
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66
AP. 16, TÂRGU MUREȘ, MS, RO

(72) Inventatori:
• **BACĂREA PETRUȘ FĂNEL,**
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66
AP. 16, TÂRGU MUREȘ, MS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 3459864; EP 0738710 A1; S.
NOWSHUDDIN, A. RAM REDDY,
"DECOMPOSITION OF COPPER-AMINO
ACID COMPLEXES BY SODIUM SULFIDE",
TETRAHEDRON LETTERS, 47,
PP. 5159-5161, 2006

(54) **PROCEDEU DE PROTEJARE A ω -AMINO- α**
-AMINOACIZILOR SUB FORMĂ DE URETANI



Invenția se referă la un procedeu de protejare a ω -amino- α -aminoacizilor sub formă de uretani, în vederea utilizării acestora la sinteza polipeptidelor. Protejarea grupelor funcționale, care nu trebuie să fie implicate în reacțiile de policondensare, este „ortogonală”, adică este perfect stabilă în condițiile de reacție de condensare și deprotejare temporară.

Sunt cunoscute multe metode de protejare a grupărilor funcționale α -amino și ω -amino din aminoacizi bazici de genul lizinei sau ornitinei, încadrate în diferite scheme de protecție ortogonală. În cazul schemelor benzil-oxi-carbonil-t-butil-oxi-carbonil (Z/Boc) sau fluorenil-metil-oxi-carbonil-t-butil-oxi-carbonil (Fmoc/Boc) în lucrarea “Peptides: Chemistry and Biology” (Norbert Sewald, Hans-Dieter Jakube, 2002, Wiley-VCH, Verlag GmbH, ISBN: 3-527-30405-3), sunt prezentate metode de sinteză, în mai multe etape, care presupun blocarea provizorie a grupării ω -amino sub formă de bază Schiff cu benzaldehida, blocarea, de asemenea provizorie, a α -amino cu benzil-oxi-carbonil (Z), deblocarea grupării ω -amino prin descompunerea acidă a bazei Schiff și blocarea cu t-butil-oxi-carbonil, eliminarea grupei protectoare Z prin hidrogenare catalitică și blocarea finală a grupei α -amino cu fluorenil-metil-oxi-carbonil. Se obține, în cazul lizinei, N^t-t-butil-oxi-carbonil-N^α-fluorenil-metil-oxi-carbonil-lizină, utilizabilă pentru sinteza de polipeptide cu structură controlată.

O altă categorie de procedee, prezentate în brevetele USP 3459864, din 1969, EP 0738710 A1, din 1996, PL 330243, PL 330245, PL 330246, din 1998, PL 344809, PL 344810 și PL 345912, presupune utilizarea complexșilor de cupru bivalent, pentru blocarea provizorie, simultană, a grupelor α -amino și carboxil, care face posibilă protejarea selectivă a grupei ω -amino, direct sub formă de derivat t-butil-oxi-carbonil (Boc). Urmează eliberarea aminoacidului N^ω-protejat și protejarea grupării α -amino sub formă de derivat fluorenil-metil-oxi-carbonil (Fmoc). Ca sursă de ioni Cu²⁺, s-au utilizat carbonatul bazic de cupru, sulfatul de cupru cu hidroxid de sodiu (ca agent alcalin), acetat de cupru și hidroxid de sodiu. Excesul de di-t-butil-dicarbonat (anhidridă Boc - Boc₂O) era distrus cu metanol, iar aminoacidul parțial protejat la gruparea ω -amino era eliberat din complex prin tratare cu un exces de 8-hidroxichinolină. În alte lucrări (Nowshuddin, S; Ram Redy. A., Tetrahedron Lett. 47, 5159-5161, 2006 și Sailaia, G; Nowshuddin, S; Rao, M.N.A. Tetrahedron Lett. 45, 9297-9298, 2004), descompunerea complexului se realiza prin precipitarea cuprului sub formă de sulfură, cu hidrogen sulfurat sau sulfură de sodiu, sau reducerea cuprului la oxid cupros insolubil sau la cupru metalic, cu borohidruură de sodiu. După operațiile de separare și purificare a intermediarului semiprotejat, se trecea la faza de protejare finală cu Fmoc.

Metoda care presupune protejări și deprotejări provizorii este foarte laborioasă, utilizează cantități mari de solvenți volatili, conduce la un randament final mic și este dificil de aplicat industrial.

Utilizarea carbonatului bazic de cupru sau a hidroxidului de cupru prezintă dezavantajul impreciziei de dozare, din cauza instabilității și compoziției variabile a acestor compuși, și necesității de a se lucra la temperatură ridicată (pericol de racemizare). Utilizarea sulfatului de cupru este convenabilă, dar hidroxidul de sodiu, ca agent alcalin, face dificil controlul pH-ului (parametru foarte important pentru asigurarea reactivității grupării amino, a stabilității complexului și evitarea descompunerii hidrolitice a reactantului Boc₂O). Descompunerea excesului de Boc₂O cu metanol complică procesul tehnologic și este de preferat să se evite. Descompunerea complexului prin schimb de liganzi cu 8-hidroxichinolină presupune utilizarea în exces a unui compus scump, toxic, care creează probleme cu apele reziduale. Precipitarea cuprului sub formă de Cu₂S, utilizând hidrogen sulfurat sau sulfura de sodiu, prezintă dezavantaje legate de dificultatea evitării excesului, toxicitate, precipitat

coloidal, greu filtrabil. Separarea cuprului prin reducere cu borohidru $r\grave{a}$ de sodiu în mediu alcalin decurge rapid, dar este necesar un mare exces față de stoichiometrie, este posibilă reoxidarea aeriană, ceea ce reclamă lucru sub atmosferă controlată sau menținerea, pe tot parcursul prelucrării, a unui exces de reducător și, mai ales, există o tendință de reducere a carboxilului la hidroxil. Din motivele enumerate, metodele analizate nu prezintă reproductibilitatea și eficiența necesare aplicării productive.	1
Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul conform invenției constă în elaborarea unui procedeu eficient economic, de tipul „într-un reactor - one pot”, care utilizează materii prime accesibile și cu toxicitate redusă, parametri simpli de controlat, ușor de aplicat industrial, pentru fabricarea amino-aminoacizilor protejați, în scopul utilizării la sinteze de polipeptide și ca blocuri sintetice, pentru realizarea altor compuși fiziologic activi.	3
Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele menționate anterior, prin aceea că formarea complexului cupric se realizează utilizând sulfat de cupru și carbonat de sodiu, care formând un tampon de pH cu bicarbonatul rezultat din reacție, facilitează menținerea pH-ului în intervalul optim (8,5...10,5), excesul de Boc_2O se distruge hidrolitic, prin asigurarea unui timp de perfectare suficient (între 8 și 20 h), eliberarea aminoacidului semiprotejat se face cu acid citric (agent acid și complexant pentru cupru, în același timp), prin salifiere cu NaCl și filtrare, urmată de reintroducerea precipitatului spălat în același reactor, peste o soluție apoasă de carbonat de sodiu, dozarea unei soluții acetone de fluorenil-metil-oxi-carbonil-O-succinimidă (Fmoc-OSu), controlând pH-ul să rămână alcalin (8,5...10,5) pe tot parcursul reacției, prin adăugare de carbonat de sodiu, extracția impurităților cu diizopropileter sau eter etilic, iar a produsului, cu acetat de etil, după acidulare și salifiere cu NaCl.	5
Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:	7
- permite obținerea concomitentă a derivatului protejat numai la grupa ω -amino, sau poate fi ușor adaptat pentru obținerea altor derivați protejați ortogonal ai lizinei, ornitinei sau altor amino-aminoacizi, cu alte grupe protectoare;	9
- procedeul este simplu, eficient, ieftin, ecologic, realizabil industrial în sistem „one pot”;	11
- rezultă produse de calitate suficientă pentru directă utilizare în sinteza de polipeptide sau alți compuși fiziologic activi;	13
- se utilizează materii prime uzuale și solvenți tehnici care pot fi recuperați prin distilare și, eventual, reutilizați în proces;	15
- cuprul se poate recupera simplu, aproape cantitativ, din filtratul de la descompunerea complexului, prin schimb cu Al, sub formă de cupru metalic;	17
- nu rezultă cantități importante de ape reziduale, iar compușii organici conținuți sunt ușor biodegradabili (citrați și succinați de sodiu).	19
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției:	21
10 mmoli L-Lys-HCl (1,827g) se dizolvă în 10 ml apă. 5 mmoli $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,25 g) se dizolvă în 10 ml apă. Se amestecă cele două soluții, apoi se aduce pH-ul la >10 cu Na_2CO_3 solid, sub agitare.	23
12 mmoli Boc_2O (2,62g) se dizolvă în 12 ml acetonă. Soluția rezultată se picură, timp de 40 min, peste soluția apoasă de complex cupric, sub agitare energică, la temperatura camerei. Pe parcursul picurării, se adaugă 12 mmoli Na_2CO_3 solid (1,3 g), divizat în 8 porții egale, la intervale de câte 5 min. Se lasă la perfectare peste noapte (8 până la 20 h).	25
La reluare, se adaugă 50 ml soluție 10% de acid citric, sub agitare, la temperatura camerei. Se verifică ca pH-ul să fie 2...2,5. Dacă trebuie, se mai adaugă acid citric solid, pentru scăderea pH-ului. După descompunerea complexului (modificarea culorii), se adaugă NaCl solid, până la saturare. Precipitatul format se filtrează și se spală cu soluție saturată de NaCl, până la absența Cu^{2+} (hârtie cu Na_2S).	27

RO 126201 B1

- 1 Precipitatul umed se reintroduce în vasul de reacție peste 40 ml soluție 10% de
Na₂CO₃, sub agitare, la temperatura camerei. După dizolvare, se obține o soluție clară. Dacă
3 soluția nu este clară, se extrag impuritățile cu 2x20 ml hexan. 13 mmoli FmocOSu (4,05 g)
se dizolvă în 80 ml acetonă uscată. Soluția obținută se picură timp de 60 min peste soluția
5 apoasă din vasul de reacție, sub agitare energetică, la temperatura camerei. La terminarea
adăugării, se verifică ca pH-ul să fie alcalin. Se mai lasă la perfectare, sub agitare, 2 h. Se
7 diluează masa de reacție cu 120 ml apă. Impuritățile se extrag cu 2x30 ml eter etilic, apoi se
adaugă clorură de sodiu până la saturare și 50 ml acetat de etil. Se acidulează cu acid citric
9 solid ($\approx$ 8 g), controlând ca pH-ul să fie 2...2,5. Faza apoasă se drenează, iar faza organică
se mai spală cu 2x30 ml soluție saturată de clorură de sodiu, apoi se usucă pe sulfat de
11 sodiu anhidru și se concentrează sub vid de 50...150 mbari și 45°C, până se obține un ulei.
Uleiul se dizolvă, sub agitare, în 30 ml diizopropileter, din care, în timp, cristalizează
13 produsul. Se filtrează și se spală pe filtru, cu 3x5 ml diizopropileter. Se usucă la vid și
temperatură de maximum 45°C.
- 15 Se obțin 3,98 g produs, față de teoretic, 4,68 g, adică un randament de 85% față de
lizina inițial luată în lucru, comparativ cu un randament de 35%, prin metoda veche, cu
17 protejări și deprotejări provizorii.

Procedeu de protejare a ω -amino- α -aminoacizilor sub formă de uretani, caracterizat prin aceea că , în scopul introducerii selective a unor grupe protectoare la cele două grupe funcționale ω -amino și α -amino, se blochează, în primul rând, simultan, grupările carboxil și α -amino ale aminoacidului, prin formarea unui complex cupric care rezultă din reacția aminoacidului cu sulfat de cupru în prezență de carbonat de sodiu, care asigură controlul pH-ului în intervalul optim 8,5...10,5, urmează apoi blocarea grupării ω -amino a aminoacidului, prin tratarea complexului cupric cu dicarbonat de di-t-butil în prezență de carbonat de sodiu, excesul de dicarbonat de di-t-butil fiind distrus hidrolitic, prin lăsarea amestecului rezultat la perfectat o perioadă de timp cuprinsă între 8 și 20 h, eliberarea aminoacidului semiprotejat se face cu acid citric prin salifiere cu NaCl și filtrare urmată de reintroducerea precipitatului spălat, în același reactor, peste o soluție apoasă de carbonat de sodiu și de dozarea unei soluții acetonice de fluorenil-metil-oxi-carbonil-O-succinimidă, pH-ul fiind menținut pe tot parcursul reacției între 8,5 și 10,5, prin adăugare de carbonat de sodiu, în final, extracția impurităților fiind realizată cu diizopropil-eter, iar a produsului finit, cu acetat de etil, după acidulare și salifiere cu NaCl.	3 5 7 9 11 13 15 17
---	--

