



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00834

(22) Data de depozit: 19.10.2009

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

(71) Solicitant:  
• 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

(54) PROCEDEU DE PROTEJARE A  $\omega$ -AMINO- $\alpha$ -AMINO-ACIZILOR SUB FORMĂ DE URETANI

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de protejare a  $\alpha$ ,  $\omega$ -diaminoacizilor sub formă de uretani, pentru utilizarea acestora la sinteza unor polipeptide. Procedeu conform invenției constă din introducerea selectivă a grupărilor protectoare la cele două grupări funcționale amino, prin blocarea simultană a carboxilului și grupării  $\alpha$  amino, utilizând sulfat de cupru și carbonat de sodiu, pentru controlul pH-ului în intervalul 8,5...10,5, după care complexul cupric format este tratat cu dicarbonat de *terț*-butil, în scopul protejării grupării  $\omega$ -amino, după

care complexul cupric este descompus cu acid citric, prin salifiere cu NaCl, și precipitatul se filtrează și se spală, după care se dizolvă într-o soluție 10% de carbonat de potasiu și se tratează cu o soluție de fluorenil-metiloxicarbonil-O-succinimidă, la un pH de 8,5...10,5, după terminarea reacției și prelucrare rezultând produsul protejat selectiv.

Revendicări: 2



## PROCEDEU DE PROTEJARE A $\omega$ -AMINO- $\alpha$ -AMINO-ACIZILOR SUB FORMĂ DE URETANI

Invenția se referă la un procedeu de protejare a  $\omega$ -amino- $\alpha$ -amino-acizilor 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  $\alpha$ -amino și  $\omega$ -amino din amino-acizi 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) sunt cunoscute metode de sinteză, în mai multe etape, care presupun blocarea provizorie a grupării  $\omega$ -amino sub formă de bază Schiff cu benzaldehida, blocarea, de asemenea provizorie, a  $\alpha$ -amino cu benzil-oxi-carbonil (Z), deblocarea grupării  $\omega$ -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  $\alpha$ -amino cu Fluorenil-metil-oxi-carbonil. Se obține, în cazul lizinei, N<sup>t</sup>-t-butil-oxi-carbonil-N<sup>α</sup>-fluorenil-metil-oxi-carbonil-lizină utilizabilă pentru sinteza de polipeptide cu structură controlată. O altă categorie de procedee presupune utilizarea complexilor de cupru bivalent pentru blocarea provizorie, simultană, a grupelor  $\alpha$ -amino și carboxil, care face posibilă protejarea selectivă a grupei  $\omega$ -amino direct sub formă de derivat t-butil-oxi-carbonil (Boc). Urmează eliberarea amino-acidului N<sup>ω</sup>-protejat și protejarea grupării  $\alpha$ -amino sub formă de derivat fluorenil-metil-oxi-carbonil (Fmoc). Ca sursă de ioni Cu<sup>2+</sup> s-a utilizat carbonatul bazic de cupru, sulfatul de cupru și hidroxidul de sodiu (ca agent alcalin), acetatul de cupru și hidroxidul de sodiu. Excesul de di-t-butil-dicarbonat (anhidridă Boc – Boc<sub>2</sub>O) era distrus cu metanol, iar amino-acidul parțial protejat la gruparea  $\omega$ -amino era eliberat din complex prin tratare cu un exces de 8-hidroxichinolină. În alte lucrări descompunerea complexului se realiza prin precipitarea cuprului sub formă de sulfură, prin tratarea cu hidrogen sulfurat sau sulfură de sodiu, sau reducerea cuprului la oxid cupros insolubil sau la cupru metalic, utilizând borohidruură de sodiu. După operațiile de separare și purificare a intermediarului semiprotejat, se trecea la faza de protejare finală cu Fmoc.

1 9 -10- 2009

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 al 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  $\text{Boc}_2\text{O}$ ). Descompunerea excesului de  $\text{Boc}_2\text{O}$  cu metanol complică procesul tehnologic și e de preferat să se evite. Descompunerea complexului prin schimb de liganzi cu 8-hidroxichinolină presupune utilizarea în exces a unui compus scump, toxic, care crează probleme cu apele reziduale. Precipitarea cuprului sub formă de  $\text{Cu}_2\text{S}$  utilizând hidrogen sulfurat sau sulfură de sodiu prezintă dezavantaje legate de dificultatea evitării excesului, toxicitate, precipitat coloidal, greu filtrabil. Separarea cuprului prin reducere cu borohidruură de sodiu în mediu alcalin decurge rapid, dar este necesar un mare exces față de stoechiometrie, 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.

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- amino-acizilor protejați în scopul utilizării la sinteze de polipeptide și ca blocuri sintetice pentru realizarea altor compuși fiziologic activi.

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 (9 – 10,5), excesul de  $\text{Boc}_2\text{O}$  se distruge hidrolitic prin asigurarea unui timp de perfectare suficient, eliberarea amino-acidului semiprotejat se face cu acid citric (agent acid și



complexant pentru cupru în același timp), prin salefieră cu NaCl și filtrare, urmată de reintroducerea precipitatului spălat în același reactor, peste o soluție apoasă de carbonat de sodiu, dozarea unei soluții acetonice de Fluorenil-metil-oxi-carbonil-O-succinimidă (Fmoc-OSu), controlând pH-ul să rămână alcalin (9 – 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 salefieră cu NaCl.

Procedeeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- 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-amino-acizi, cu alte grupe protectoare.
- Procedeeul este simplu, eficient, ieftin, ecologic, realizabil industrial în sistem „one pot”,
- Rezultă produse de calitate suficientă pentru directă utilizare în sinteza de polipeptide sau alți compuși fiziologic activi,
- Se utilizează materii prime uzuale și solvenți tehnici care pot fi recuperați prin distilare și, eventual, reutilizați în proces,
- Cuprul se poate recupera simplu, aproape cantitativ, din filtratul de la descompunerea complexului prin schimb cu Al, sub formă de cupru metalic.
- Nu rezultă cantități importante de ape reziduale, iar compușii organici conținuți sunt ușor biodegradabili (citrați și succinați de sodiu).

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției:

10 mmoli L-Lys·HCl (1,827g) se dizolvă în 10 ml apă. 5 mmoli CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1,25g) se dizolvă în 10 ml apă. Se amestecă cele două soluții, apoi se aduce pH-ul la > 10 cu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solid, sub agitare.

12 mmoli Boc<sub>2</sub>O (2,62g) se dizolvă în 12 ml acetonă. Soluția rezultată se picură, timp de 40 minute, peste soluția apoasă de complex cupric, sub agitare energică, la temperatura camerei. Pe parcursul picurării, se adaugă 12 mmoli Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solid (1,3g), divizat în 8 porții egale, la intervale de câte 5 minute. Se lasă la perfectare peste noapte.

La reluare, se adaugă 50 ml soluție 10% de acid citric, sub agitare, la temperatura camerei. Se verifică pH-ul să fie 2-2.5. Dacă trebuie, se mai adaugă acid citric solid, pentru scăderea pH-

1 9 -10- 2009

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  $\text{Cu}^{2+}$  (hârtie cu  $\text{Na}_2\text{S}$ ).

Precipitatul umed se reintroduce în vasul de reacție peste 40ml soluție 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , sub agitare, la temperatura camerei. După dizolvare, se obține o soluție clară. Dacă soluția nu este clară, se extrag impuritățile cu 2x20 ml hexan. 13 mmoli FmocOSu (4.05g) se dizolvă în 80 ml acetonă uscată. Soluția obținută se picură timp de 60 minute peste soluția apoasă din vasul de reacție, sub agitare energică, la temperatura camerei. La terminarea adăugării se verifică pH-ul să fie alcalin. Se mai lasă la perfectare, sub agitare, 2 ore. Se 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 solid ( $\approx 8\text{g}$ ), controlând 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 sodiu anhidru și se concentrează sub vid de 50-150 mbarr și  $45^\circ\text{C}$  până se obține un ulei. Uleiul se dizolvă, sub agitare, în 30 ml diizopropileter, din care, în timp, cristalizează produsul. Se filtrează și se spală pe filtru cu 3x5 ml diizopropileter. Se usucă la vid și temperatură de maximum  $45^\circ\text{C}$ .

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 protejări și deprotejări provizorii.



## REVENDICĂRI

1. Procedeu de protejare a amino-amino-acizilor sub formă de uretani caracterizat prin aceea că, în scopul introducerii selective a grupelor protectoare la cele două grupe funcționale amino, se blochează simultan carboxilul și grupa  $\alpha$ -amino prin formarea complexului cupric utilizând sulfat de cupru și carbonat de sodiu pentru controlul pH-ului în intervalul optim 8,5 – 10,5 , excesul de dicarbonat de di-t-butil utilizat la blocarea grupei  $\omega$ -amino se distruge hidrolitic prin asigurarea unui timp de perfectare suficient, eliberarea amino-acidului semiprotejat se face cu acid citric (agent acid și complexant în același timp), prin salefieri 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 controlând pH-ul să rămână alcalin (8,5 – 10,5) pe tot parcursul reacției prin adăugare de carbonat de sodiu, extracția impurităților cu diizopropil-eter, iar a produsului cu acetat de etil, după acidulare și salefieri cu NaCl.
2. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că utilizează carbonatul de sodiu care asigură un control stabil al pH-ului și a acidului citric concomitent cu salefierul, care permite separarea intermediarului în stare solidă suficient de pur pentru continuarea procesului în sistem „ în același reactor”, foarte convenabil pentru aplicare industrială.

