



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01288

(22) Data de depozit: 02.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.09.2013 BOPI nr. 9/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ELECTROCHIMIE ȘI MATERIE
CONDENSATĂ - INCEMC - TIMIȘOARA,
STR.DR.AUREL PĂUNESCU PODEANU
NR.144, TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• SEGNEANU ADINA-ELENA,
STR.MARTIR I.STANCIU NR.8, AP.12,
TIMIȘOARA, TM, RO;

• GROZESCU IOAN, STR.DUNĂREA
NR.160, SAT GHIRODA,
COMUNA GHIRODA, TM, RO;
• MACARIE AMALIA CORINA,
STR.ANDREI MUREȘANU NR.11,
BAIA MARE, MM, RO;
• MILEA MARIUS SILVIU, ALEEA MUZICII
NR.1, BL.6, AP.1, TIMIȘOARA, TM, RO

(54) PROCEDEU MODERN DE OBTINERE A UNEI DIPEPTIDE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor dipeptide pentru aplicații în industria alimentară sau farmaceutică. Procedeu constă în aceea că, într-o soluție de carbonat reactiv mixt, dizolvat în diclormetan, se adaugă un aminoacid liber și amina alifatică terțiară, la temperatura camerei, sub agitare, timp de 24 h, după care se introduce al doilea aminoacid cu grupare

carboxil protejată și amina alifatică terțiară, la rece adăugându-se agentul de cuplare, după care masa de reacție este menținută timp de câteva ore la o temperatură de -10...-20°C, apoi dipeptida se izolează din masa de reacție prin filtrare, și se purifică.

Revendicări: 1



Procedeu modern de obtinere a unei dipeptide

Inventia se refera la un procedeu de obtinere intr-o singura etapa a unor peptide de dimensiuni mici (dipeptide) pentru aplicatii in industria alimentara ca si edulcoranti, sau farmaceutica, ca si precursori de medicamente.

Peptidele joaca un rol crucial in functiile fiziologice si biochimice fundamentale ale vietii si se gasesc sub forma de enzime, hormoni, antibiotice, receptori, etc. Ele sunt prezente in fiecare celula vie si posedă o varietate de activități biochimice.

În sinteza de peptide se folosesc grupări amino-protectoare de tip alcoxicarbonil (carbamați) provenite de la un carbonat simetric și alcoolii primari, secundari sau terțiari.

Denumirea poliamidelor generate prin policondensarea α -aminoacizilor difera după gradul de policondensare al acestora. Convențional se considera peptide produșii cu maxim 10 resturi de monomer, polipeptide cei cu maxim 50 resturi de monomer și protein dacă gradul de policondensare depășește 50, putând fi și de ordinul zecilor de mii. Peptidele pot fi simple dacă la formarea lor participa un singur aminoacid sau mixte atunci când în structura lor exista resturi ale unor aminoacizi diferiți. Nomenclatura peptidelor este cea generală a amidelor. Dipeptidele de exemplu se denumesc prin precizarea restului acil legat de gruparea amino a unui α -aminoacid. Prin convenție, grupa amino liberă se scrie în stânga (aminoacid N-terminal) iar restul carboxilic în dreapta (aminoacid C-terminal). Se considera drept lanț principal catena ce include puntea peptidică și centrul chiral. Prin opoziție, un lanț lateral este cel format de substituții alchilici grefați la stereocentru. La formarea peptidelor de cele mai multe ori α -aminoacizii componenți intervin cu configurația sterică S.

Se cunosc mai multe procedee de obtinere a dipeptidelor:

1. Prin reacția clorurii acide a unui aminoacid cu gruparea amino blocată cu un alt aminoacid având gruparea amino liberă și gruparea carboxilică blocată, în final având loc îndepărtarea grupărilor protectoare. Dezavantajul metodei constă în aceea că grupele care generează legătura peptidică (gruparea amino a restului N-terminal și gruparea COOH liberă a restului C-terminal) pot reacționa și cu alte grupări funcționale ale aminoacizilor, cum ar fi gruparea ϵ -amino a lizinei, gruparea SH a cisteinei, etc. Aceste grupări reactive trebuie blocate sau protejate prin reacții specifice, iar după formarea legăturii peptidice, grupările protectoare blocante trebuie îndepărtate. Din acest motiv, adăugarea fiecărui rest de aminoacid în timpul



[Handwritten signature]

sintezei unui lanț polipeptidic necesită numeroase trepte de reacție pentru atașarea și îndepărtarea grupărilor blocante.

2. Separare din surse naturale care prezintă atât dezavantajul ca dipeptidele se găsesc în concentrații extreme de mici în țesutul proaspăt iar localizarea celulelor este posibilă doar cu ajutorul unor metode foarte sensibile, cât și acela că există pericolul ridicat de contaminare cu diferiți viruși patogeni,

3. Sinteza chimică directă este, în majoritatea cazurilor o variantă foarte atractivă și prezintă importanță deoarece unele peptide se găsesc în natură doar în cantități extrem de mici, de ordinul nanogramelor. Un alt avantaj al sintezei chimice este acela că permite obținerea unor peptide cu puritate mai ridicată decât în cazul izolării sale din surse naturale (corticotropina, secretina, glucagonul). Dezavantajul metodei este dat, în primul rând de timpul de reacție. Prima sinteză chimică a insulinei a fost realizată la începutul anilor 1960 și a fost nevoie de 2 ani pentru a se obține structura completă.

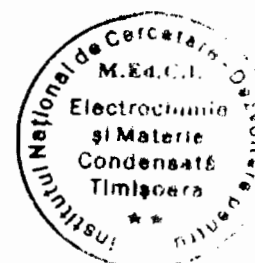
Invenția se referă la un procedeu de obținere într-o singură etapă a unor peptide de dimensiuni mici (dipeptide) pentru aplicații în industria alimentară ca și edulcoranți, sau farmaceutică, ca și precursori de medicamente, în care grupa amino a unui aminoacid este protejată cu un carbonat mixt cu grupa nucleofugă, iar în etapa de cuplare se folosește diciohexilcarbodiimidă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu îmbunătățit de obținere a unei dipeptide cu păstrarea activității optice care este esențială pentru păstrarea activității biologice a dipeptidelor.

Procedeu îmbunătățit de obținere a unei dipeptide conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că, în prima etapă, cea de protejare, are loc alcoxicarbonilarea aminoacidului liber (fenilglicină) cu un carbonat mixt reactiv cu grupa nucleofugă, în prezența unei amine alifatică terțiare (trietilaminei) în mediu de diclorometan, la un raport molar al reactanților de 1:1:1, iar în cea de-a doua etapă, cuplarea aminoacidului N-protejat, N-Benziloxi-fenilglicina, cu cel de al doilea aminoacid protejat la gruparea carboxil, în prezență de diciohexilcarbodiimidă și trietilamină, într-un raport molar de 1:1:1,1:1,1, în mediu de diclorometan. Pentru a minimaliza racemizarea s-a utilizat în etapa de cuplare un amestec DCC – hidroxisuccinimidă.

Avantajul invenției constă în aceea că:

- Menținerea activității optice și implicit a celei biologice,



[Handwritten signature]

- Eficientizarea proceselor tehnologice de sinteza a unor precursori cu aplicatii in industria farmaceutica si alimentara,
- Costuri de procesare scazute prin micșorarea timpului de reactie, iar produsii secundari, netoxici, pot fi reutilizati;

Se dă în continuare **un exemplu** de realizare a invenției, referitor la un procedeu de obținere într-o singura etapa a unor peptide de dimensiuni mici (dipeptide):

La o solutie de 0.3-6 g carbonat reactiv mixt in 6-9 ml diclorometan se adauga aminoacid liber 0,1-0,35g si amina alifatica terciara 0,1-0,3ml. Amestecul de reactie este lasat la temperatura camerei, sub agitare, timp de 24 ore. Peste solutia obtinuta anterior se introduce al doilea aminoacid cu grupa carboxil protejata (0,15-0,25g) si amina alifatica terciara (trietilamina) (0,1-0,3ml). Se adauga la rece (0°C) agentul de cuplare (0,15-0,38), dupa care masa de reactie este mentinuta la o temperature cuprinsa intre -10°C si -20°C timp de cateva ore (24). Reactia decurge conform schemei din figura 1.

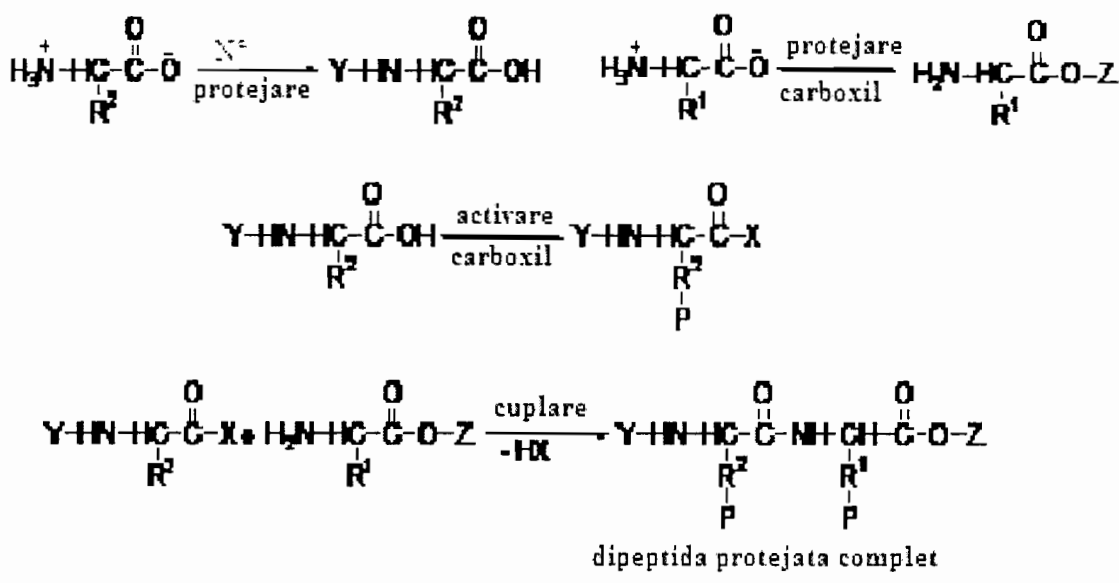


Figura 1. Schema de obtinere a unei dipeptide

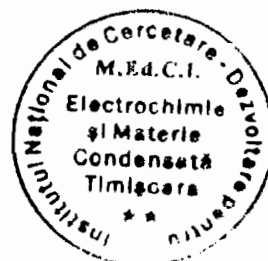
Dupa filtrarea precipitatului rezultat (uree), filtratul este reluat cu diclorometan (2-5ml),dupa care se spala cu apa. pH-ul solutiei organice se ajusteaza cu o solutie de 5% de bicarbonate de sodium (2x4ml), apa si o solutie saturata de clorura de sodium. Dupa care se usuca pe Na₂SO₄ anhidru. Dupa filtrare, solventul se evapora la vid apoi excesul este indepartat prin recristalizari repetate, astfel obtinandu-se un produs alb, cristalin ce a fost caracterizat prin metode cromatografice, spectroscopie FTIR, spectroscopie RMN (rezonanta magnetica nucleara).



[Handwritten signature]

Revendicari

Procedeu de obținere a unor dipeptide **caracterizat prin aceea că**, printrun proces de reactive, ce consta in cuplarea aminoacidului N-protejat cu carbonatul mixt reactiv cu cel de-al doilea aminoacid protejat la grupa carboxil in prezenta unui amestec format din agentul de cuplare si produsul secundar, reutilizat, al reactiei de N-protejare (grupa nucleofuga din carbonatul mixt reactiv), se obtine dipeptida care se izoleaza din mediul de reactie si se caracterizeaza din punctul de vederea al structurii, puritatii, randamentului reactiei si al proprietatilor optice.



[Handwritten signature]