

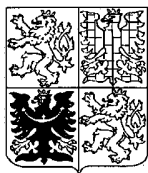
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 210

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.07.1997**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.07.1996**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/19630082**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/03752**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/04523**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
C 07 D 207/22

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen,
DE;

(72) Původce:

Mack Helmut, Ludwigshafen, DE;
Pfeiffer Thomas, Böhl-Iggelheim, DE;
Seitz Werner, Plankstadt, DE;
Zierke Thomas, Böhl-Iggelheim, DE;
Balkenhohl Friedhelm, Limburgerhof, DE;
Lange Udo, Ludwigshafen, DE;

(74) Zástupce:

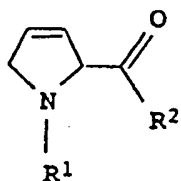
Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Příprava derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové
kyseliny**

(57) Anotace:

Řešení se týká derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny
obecného vzorce I, které jsou připraveny eliminací zbytku
kyseliny sulfonové pomocí báze ze sloučeniny obecného vzorce
II.



(I),

Příprava derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy derivátů pyrrolin-2-karboxylové kyseliny.

Dosavadní stav techniky

Nahrazení prolinu 3,4-dehydroprolinem v biologicky aktivních peptidech nebo peptidových mimetikách jen zřídka způsobuje ztrátu aktivity (A.M. Felix a kol. Int. J. Pept. Prot. Res. 10, (1977) 299; C.R. Botos a kol. J. Med. Chem. 22, (1979) 926; G.H. Fisher, W. Ryan, FEBS Lett. 107, (1979) 273); naopak v některých případech se účinek zvýší, zatímco dochází k současnému omezení toxicity (G.H. Fisher, W. Ryan FEBS Lett. 107, (1979) 273; S. Natarajan a kol., v Peptide, Structure and Biological Function, E. Gross, J. Meienhofer, Ed., Pierce Chemical Company, 1979, str. 463).

Syntéza N-chráněných 3,4-dehydroprolinů v průmyslovém měřítku způsoby, které jsou popsány v literatuře, je velmi pracná, jak je ukázáno například tepelnou cis eliminací S-methylxanthátu z hydroxyprolinu způsobem, který popsal Tchugaeff. Nevýhodou tohoto způsobu je, že je nutné použít velká množství methyljodidu a vytváří se methylmerkaptan a karbonylsulfid (J.-R. Dormay a kol., Angew. Chem. 92, (1980) 761; Houben-Weil, Methoden der Organischen Chemie, Vol.

5/1b, 126 (1972)).

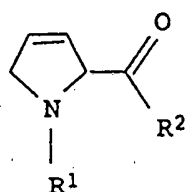
Redukce pyrrol-2-karboxylové kyseliny fosfonium-jodidem v dýmavé kyselině jodovodíkové je také problematické, protože je potřeba použít velkého přebytku plynného jodovodíku a dále protože dochází k znatelnému snížení výtěžku a začátku polymerace u velkých reakcí (J.W. Scott a kol., Synth. Commun. 10(7), (1980) 529). Na druhé straně eliminace Boc-chráněného methylesteru 4-fenylseleninylprolinu nastává za výrazně mírnějších podmínek (J.-R. Dormay, Synthesis 9, (1982) 753. Eliminace nastává při probíhání při teplotě okolí a vede k vzniku Δ^3 -olefinu s vysokou selektivitou. Tepelná cis eliminace poskytuje významná množství isomerického Δ^4 olefinu. Nicméně eliminace oxidu seleničitého je také nevýhodná v důsledku vytváření toxických residuí, obsahujících selen, což vede k nutnosti provádět nákladné ukládání v případě reakcí ve velkém měřítku a přidání dříve eliminované selenogenní kyseliny k dvojité vazbě je nevýhodné obzvláště v případě farmaceuticky aktivních složek, u nichž dokonce i nepatrná množství sloučenin obsahujících selen vedou k toxickým vlastnostem.

Malá množství 3-pyrrolinu byla získána z N-substituovaného 3-methylsulfonyloxypyrrolidinu (T. Uno a kol., J. Heterocycl. Chem. 24, (1987) 1025). Eliminace sulfonátů, například methylsulfonátu, pro přípravu derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny dosud nebylo popsáno.

Způsoby popsané v literatuře pro přípravu derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny nejsou vhodné pro průmyslovou syntézu.

Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobu přípravy derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny obecného vzorce I



(I),

ve kterém

R¹ představuje H, C₁-C₆-alkyl, benzyl, benzyl substituovaný na fenyl, allyloxykarbonyl, C₁-C₆-alkyloxykarbonyl, benzyloxykarbonyl, kde benzylový zbytek může být substituován OCH₃ radikály, nebo C₁-C₄-alkylkarbonyl nebo

R¹ představuje aminokyselinový zbytek, který je vázán prostřednictvím C konce a může být alkylován nebo acylován na dusíku,

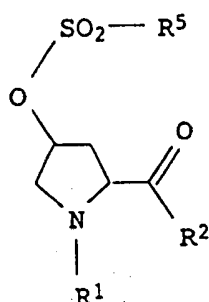
a

R² představuje OH, C₁-C₄-alkyloxy, benzyloxy nebo NR³R⁴,

kde R³ a R⁴ představují nezávisle na sobě H, C₁-C₄-alkyl, benzyl, fenyl nebo pyridyl, přičemž je možné, aby aromatické systémy v R³ a R⁴ byly substituovány až třemi stejnými nebo

04.08.99

různými substituenty zvolenými ze souboru, zahrnujícího methyl, methoxy, hydroxyl, kyano nebo atom halogenu, který zahrnuje eliminaci zbytku kyseliny sulfonové pomocí báze sulfonátu obecného vzorce II



(II),

ve kterém

R¹ a R² mají výše definovaný význam a R⁵ představuje C₁-C₆-alkyl, benzyl, trifluormethyl, naftyl nebo fenyl; které mohou být nesubstituované nebo substituované radikály zvolenými ze souboru, zahrnujícího methyl, nitro nebo atom halogenu.

R¹ výhodně představuje C₁-C₄-alkylkarbonyl, benzyl, benzyl substituovaný na fenyl, C₁-C₆-alkyloxykarbonyl a benzyloxykarbonyl. Jestliže benzyloxykarbonylový radikál je substituovaný skupinou OCH₃, nese výhodně jednu methoxy skupinu v p poloze. Obzvláště výhodný je C₁-C₆-alkyloxykarbonylový radikál.

Výhodné R² radikály jsou OH a C₁-C₄-alkoxy.

Výhodné R^5 radikály jsou C_1 - C_6 -alkyl a benzyl, obzvláště C_1 - C_4 -alkyl.

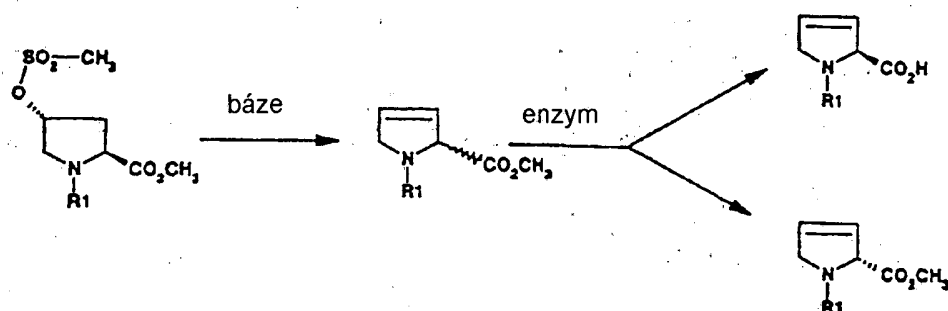
Sloučeniny I mají jeden asymetrický atom uhlíku a sloučeniny II mají dva asymetrické atomy uhlíku v 5-členném kruhu. Sloučeniny obecného vzorce II mohou být používány jako racemáty, směsi diastereomerů a jako diastereomericky čisté a enantiomericky čisté sloučeniny. Sloučeniny I mohou proto být získány, v závislosti na stereochemické struktuře sloučenin II, použitých jako prekursory a v závislosti na reakčních podmínkách, jako racemáty nebo v opticky aktivní formě.

Sloučeniny obecného vzorce II mohou být připraveny způsoby, popsány v literatuře (například D.J. Abraham, M. Mokotoff, L. Sheh, J. E. Simmons, J. Med. Chem. 26(4), (1983) 549).

Eliminace zbytku kyseliny sulfonové, to jest skupiny $-O-SO_2-R^5$, z opticky aktivní sloučeniny obecného vzorce II probíhá s racemizací, pokud R^2 představuje C_1 - C_4 -alkoxy nebo benzyloxy. To vede ke vzniku racemických esterů 3,4-dehydroprolinu, což umožňuje získat následující enzymatickým rozdělením racemátu jak D-, tak i L-3,4-dehydroprolinové deriváty (způsob A):

Způsob A:

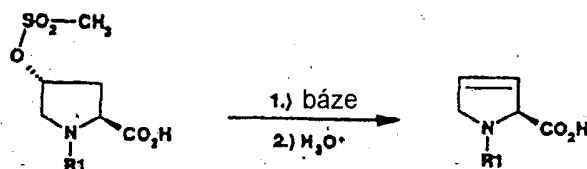
($R^5 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OCH}_3$)



Obzvláště výhodné provedení způsobu spočívá v použití sloučeniny obecného vzorce II, kde R^2 představuje OH a absolutní konfigurace zbytku karboxylové kyseliny je fixována, to jest odpovídá buď konfiguraci R nebo konfiguraci S, což umožní získat odpovídající karboxylové kyseliny obecného vzorce I bez racemizace. (Způsob B):

Způsob B:

($R^5 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OH}$)



Pro eliminační reakce A a B jsou vhodná aprotická rozpouštědla, obzvláště DMF, dioxan, THF, DME, DMSO, CH_3CN ,

přičemž je možné, aby rozpouštědlo obsahovalo malá množství vody nebo alkoholu.

V závislosti na způsobu se použijí 1,0-1,5 ekvivalenty báze (způsob A) nebo 2,0-3,0 ekvivalenty báze (způsob B), přičemž vhodné báze jsou hydridy, amidy a alkoholáty lithia, sodíku, draslíku, rubidia, cesia, vápníku nebo hořčíku, ale výhodně uvedené sloučeniny sodíku a draslíku. Sodíkové alkoholáty jsou výhodně používány jako báze, jejich vhodné alkoholátové zbytky jsou přitom odvozeny od primárních, sekundárních a terciálních alkoholů. Je také možné použít dioly, trioly, etherové alkoholy tri-, di- nebo monoethylenglykolů monoetherového typu nebo aminoalkoholy. Obzvláště výhodné jsou: triethylenglykol monomethylether, diethylenglykol monomethylether nebo ethyleneglykol monomethylether, dimethylamino-ethanol nebo 2-[2-(dimethylamino)ethoxy]-ethanol.

Eliminace sulfonátových skupin probíhá dokonce i při teplotě -20°C . Reakce může obecně být prováděna při teplotách od -20°C do $+100^{\circ}\text{C}$. Reakce je výhodně prováděna při teplotách od -10°C do 60°C . Eliminace sulfonátové skupiny z odpovídajících esterů způsobem A probíhá s racemizací dokonce i při teplotě -20°C na α atomu uhlíku takto vytvářeného esteru 3,4-dehydroprolinu.

Je překvapivé, že způsob v obzvláště výhodné variantě způsobu B může být prováděn s prekursory obecného vzorce II, kde R^2 představuje OH a kde zbytky karboxylové kyseliny mají buď konfiguraci R nebo konfiguraci S, takřka bez racemizace. Báze výhodně použité v této variantě jsou hydridy, primární

alkoholáty, primární etheralkoholáty nebo primární aminoalkoholáty. 2-Methoxyethanolát, 2-(2-methoxyethoxy)ethanolát nebo 2-[2-(dimethylamino)-ethoxy]ethanolát jsou obzvláště výhodně používány. Na ekvivalent prekursoru jsou výhodně použity 2,0 to 2,5 ekvivalenty báze. Výhodné teplotní rozmezí pro reakci způsobu B je od -10 °C do +25 °C.

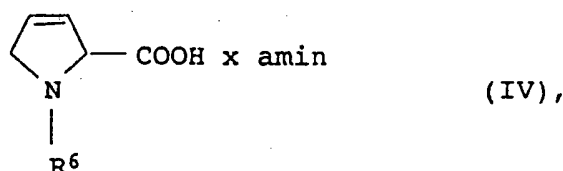
Báze použitá pro eliminaci může být reakční směs přidána v pevné fázi, ale může také být připravena in situ před reakcí. Jestliže například báze použitá pro eliminaci je 2-methoxyethanolát sodný, tato báze může být výhodně připravena in situ přidáním po kapkách vhodného alkoholu do roztoku nebo suspenze sodné soli silnější báze jako je hydrid sodný, terc.-butoxid sodný nebo bis(trimethylsilyl)amid sodný. Reakce může být prováděna polodávkově buď přiváděním roztoku báze do rozpuštěného prekursoru obecného vzorce II nebo, výhodně, přiváděním roztoku prekursoru II do roztoku nebo suspenze báze.

Reakční směs může být potom zpracována destilací, extrakcí, krystalizací, chromatografií nebo jejich kombinací.

Požadovaný enantiomer může být izolován z racemického 3,4-dehydroprolinu buď (+)- nebo (-)-vinnou kyselinou (viz J.W. Scott a kol., Synthetic Communications 10 (1980) 529 a U.S. patent 4,111,951) nebo racemátové oddělení může být prováděno opticky aktivním 1-(4-nitrofenyl)-ethylaminem po přípravě Boc-chráněné aminokyseliny (U.S. patent 4,066,658, J.-U. Kahl, T. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 8, (1981) 1445).

N-chráněné 3,4-dehydroproliny, připravené bez racemizace výhodným způsobem B, mohou být výhodně čištěny krystalizací jako amonné soli s achirálními aminy. Obzvláště je možné získat L-boc-3,4-dehydroprolin v čisté formě jako diethylamonnou sůl.

Vynález se proto týká sloučenin obecného vzorce IV



ve kterém

R^6 představuje aminovou ochranou skupinu a amin je mono-, di- nebo trialkylamin, kde alkylové zbytky obsahují 1-4 atomy uhlíku a mohou být nahrazeny C_5 - C_7 -cykloalkylovými zbytky a jejich opticky aktivními D a L formami. R^6 představuje výhodně boc ochrannou skupinu a „amin“ je výhodně diethylamin nebo dicyklohexylamin.

Estery získané způsobem A mohou být velmi účinně částečně štěpeny použitím enzymů jako jsou lipázy, esterázy a proteázy, což vede k jednomu antipódu volné kyseliny, zatímco druhý antipód zůstává ve formě esteru.

Jako hydrolázy v uvedeném způsobu A může být použito velké množství enzymů. Výhodně jsou používány proteázy, esterázy a obzvláště lipázy. Mikrobiální lipázy jsou obzvláště vhodné lipázy a mohou být izolovány například z kvasinek nebo bakterií. Další obzvláště vhodné hydrolázy jsou enzymy,

které je možno komerčně získat od společnosti Novo Nordisk (Enzyme Toolbox), obzvláště lipázy SP 523, SP 524; SP 525, SP 526 a @Novozym 435.

Je dále možné výhodně použít ve způsobu podle předloženého vynálezu lipázy "Chirazyme L1 až L8", které jsou komerčně dostupné (Boehringer Mannheim).

Mohou být také použity esterázy (jako je esteráza z vepřových jater).

Enzymy mohou být použity v přírodní nebo v imobilizované formě.

Štěpení esteru se provádí prováděn v pufru při pH 6-8 a výhodně při teplotě okolí.

Nový způsob umožňuje připravit sloučeniny I velmi jednoduchým způsobem. To je obzvláště důležité pro přípravu dehydroprolinových derivátů, které bylo dosud možno připravovat jen obtížně a v některých případech s nevalným výtěžkem.

Opticky aktivní N-chráněné deriváty 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny se získají novým způsobem obzvláště výhodně jako volné kyseliny nebo ve formě esteru, ze kterého může být volná kyselina uvolněna, výhodně enzymaticky.

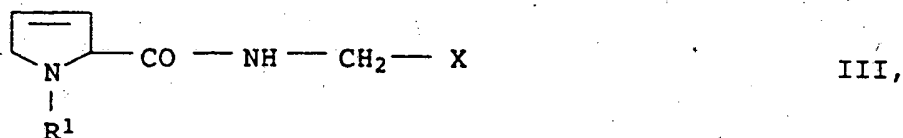
Jestliže opticky aktivní kyselina je připravena z esteru enzymaticky, zůstává jeden antipód esteru nezměněn. Ten může být například racemizován s bázemi a vystaven enzymatickému

štěpení znovu.

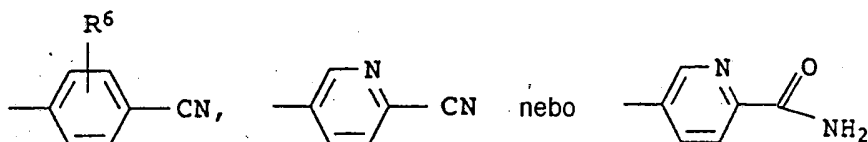
Výhodou předloženého vynálezu je, že umožňuje poprvé připravovat 3,4-dehydroprolinové deriváty ve stericky čisté formě jednoduchým způsobem a za mírných podmínek a současně za reakčních podmínek, které jsou přijatelné z hlediska ochrany životního prostředí dokonce i při výrobě v průmyslovém měřítku. Je překvapivé, že eliminace zbytku kyseliny sulfonové může být prováděna dokonce i za nízkých teplot.

Látky, připravené novým způsobem, jsou velmi zajímavé. Jsou například cennými meziprodukty pro přípravu peptidových derivátů s nízkou molekulovou hmotností, které jsou trombinové inhibitory (viz WO 94/29336) a ve kterých prolinový zbytek je nahrazen dehydroprolinovým zbytkem. Bylo dále zjištěno, že 3,4-dehydroprolin může být použit pro inhibici syntézy kolagenu (US 4,066,658).

Pro další zpracování surového produktu, získaného způsobem podle předloženého vynálezu, je obzvláště výhodné, že surový produkt, získaný způsobem podle předloženého vynálezu může reagovat bez dalšího čištění pro přípravu dalších meziproduktů pro přípravu peptidových derivátů, které také mohou být velmi snadno čištěny. Tyto meziprodukty mají obecný vzorec



ve kterém R^1 má výše uvedený význam a X představuje



($\text{R}^6 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{OH}$ nebo atom halogenu).

Tyto látky mohou být připraveny ze sloučenin I jejich aktivací v přítomnosti báze jako je triethylamin nebo diisopropylethylamin a kondenzačního činidla jako je PPA, pivaloylchlorid nebo dicyklohexylkarbodiimid/hydroxysukcinimid a následnou vazbou s $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-X}$, čímž se získají sloučeniny obecného vzorce III. Reakce se účelně provádí v rozpouštědle jako je dichloromethan, THF, dioxan, terc.-butyl-methylether, DME nebo acetonitril při teplotách od -20 do $+30$ °C.

Příklady provedení vynálezu

V příkladech jsou použity následující zkratky:

Bns = Benzylsulfonyl

Boc = terc.-Butyloxykarbonyl

DIPEA = Diisopropylethylamin

DME = Dimethoxyethan

DMF = Dimethylformamid

KOtBu = Terc.-butoxid draselný

Ms = Methylsulfonyl

PPA = Anhydrid kyseliny propylfosfonové

Pro = Prolin

Pyr = 3,4-Dehydroprolin

THF = Tetrahydrofuran

A. Příprava výchozích materiálů

a) Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OCH₃ a Boc-(L)-(4-BnsO)-Pro-OCH₃:

Methylester (4R)-N-Boc-4-hydroxy-(L)-prolinu byl ponechán reagovat s methylsulfonylchloridem a tím se získal methylester (4R)-N-Boc-4-methyl-sulfonyloxy-(L)-prolinu (D.J. Abraham, M. Mokotoff, L. Sheh, J.E. Simmons, J. Med. Chem. 26(4), (1983) 549). Reakcí podobnou reakcí s Ms chloridem byl získán methylester (4R)-N-Boc-4-benzylsulfonyloxy-(L)-prolinu použitím benzylsulfonylchloridu s výtěžkem 76 % po krystalizaci z ethanolu.

¹H-NMR (CDCl₃ δ v ppm): 7,40 a 7,28 (s, 5H, aromatický), 4,95 a 4,85 (m, 1H, O-CH), 4,40 (s, 2H, SO₂-CH₂), 4,4 - 4,25 (1H, N-CH), 3,72 a 3,71 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,7 - 3,50 (2H, N-CH₂),

04.08.99

2,53 - 1,95 (2H, CH₂, 1,45 a 1,42 (s, 9H, Boc); (2 rotamery).

b) (4R)-N-Boc-(4-MsO)-Pro-OH:

186 g (575 mmolu) methylesteru Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OCH₃ bylo hydrolyzováno v 500 ml dioxanu a 1150 ml a 1N NaOH při teplotě 0 °C po dobu 2,5 hodin. Po extrakci etherem bylo pH vodné fáze upraveno na hodnotu 3 pomocí 2N kyseliny chlorovodíkové, a produkt byl extrahován ethylacetátem. Sušení nad Na₂SO₄ a úplné odstranění rozpouštědla vedlo k získání 163 g (92 %) žlutavého oleje, jehož čistota byla 94 %. Produkt pomalu tuhnul.

[α]_D²² = -50,5° (c = 1,01; MeOH) po krystalizaci z diisopropyletheru.

¹H-NMR (CDCl₃ δ v ppm): přibližně 9 - 8 (COOH), 5,35 - 5,20 (m, 1H, O-CH), 4,60 - 4,40 (1H, N-CH), 3,95 - 3,65 (2H, N-CH₂), 3,08 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,85 - 2,25 (2H, CH₂), 1,50 a 1,40 (s, 9H, Boc); (2 rotamery)

B. Příprava konečných produktů

Příklad 1

Příprava Boc-(D/L)-Pyr-OCH₃:

a) 100 g (309 mmol) Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OCH₃ bylo rozpuštěno v 600 ml bezvodého DMF. Při teplotě 0 - 5 °C byl přidán po kapkách roztok 36,45 g (325 mmol) KOtBu v 300 ml bezvodého DMF v průběhu 1 hodiny a míchání pokračovalo při teplotě 0 -

5 °C po dobu 30 minut a při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Směs byla potom vlita do ledové vody a extrahována třikrát směsí ether/ethylacetát 5:1 a organická fáze byla znovu promývána vodou. Po sušení nad Na₂SO₄, bylo rozpouštědlo úplně odstraněno při teplotě 35 °C. Bylo získáno 68 g surového esteru, který byl destilován při teplotě 100 - 102 °C za tlaku 1,7 mbar. Vzniklý bezbarvý olej tuhnul (56 % výtěžek).

¹H-NMR (CDCl₃ δ v ppm): 6,05 - 5,95 (m, 1H, -CH=CH-), 5,80 - 5,67 (m, 1H, -CH=CH-), 5,05 a 4,98 (m, 1H, N-CH), 4,35 - 4,15 (m, 2H, N-CH₂), 3,75 a 3,74 (s, 3H, CO₂CH₃), 1,47 a 1,43 (s, 9H, Boc); (2 rotamery)

b) Tatáž sloučenina (Boc-(D/L)-Pyr-OCH₃) byla také získána z benzylsulfonátu Boc-(L)-(4-BnsO)-Pro-OCH₃. Z 5 g (12,5 mmol) uvedeného benzylsulfonátu v 50 ml bezvodého DMF, které byly přidávány kapkách do suspenze 0,5 g (12,5 mmol) NaH v 10 ml bezvodého DMF při teplotě -10 °C a potom míchány při teplotě okolí přes noc bylo získáno po zpracování podobnému eliminaci mesylátu v a) 2,2 g surového esteru. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagel (mobilní fáze: ethylacetát/hexan 2:3). Nicméně výhodná je destilace, protože chromofor je slabý.

Příklad 2

Příprava Boc-(L)-Pyr-OH:

a) 50,0 g (161,6 mmol) Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OH rozpuštěného v 650 ml DME (do kterého bylo přidáno 25 mmolu vody) bylo

přidáno po kapkách v průběhu 45 minut do 14,5 g 55-65 % NaH (přibližně 364 mmol) v 400 ml DME při teplotě okolí, teplota stoupla bez dodatečného chlazení na přibližně 30 °C. Směs byla míchána při teplotě okolí po dobu dalších 15 hodin a potom při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny, následně vlita do ledové vody a promývána třikrát směsí ether/ethylacetát 2:1. Vodná fáze byla okyselena na pH 2 pomocí 2N kyseliny chlorovodíkové a produkt byl extrahován ethylacetátem. Sušení nad Na₂SO₄ a úplné odstranění rozpouštědla vedlo k získání 36 g surové látky ve formě žlutavého oleje, který obsahoval 70 % produktu. Poměr produkt/prekursor byl určen jako 97:3 (HPLC: voda/acetonitril 8:2 + 0,1 % TFA; Merck ®Purospher RP-18e; detekce při vlnové délce 210,4 nm) a poměr enantiomerů (L):(D) byl 90:10. Proporce enantiomerů byly určovány pomocí chirální HPLC kolony jako Boc-3,4-dehydro-prolyl-3-pikolyramid po kopulaci acidické skupiny s 3-pikolyloaminovým derivátem. Dřívější výzkumy ukázaly, že sama kopulace probíhá virtuálně bez racemizace.

Podobná reakce, ale s 3 ekvivalenty NaH a mícháním při teplotě okolí po dobu 4 hodin vedla k získání 65 % produktu (produkt:prekursor = 94:6; (L):(D) = 96:4).

¹H NMR (CDCl₃, δ v ppm) : 10,5-9,5 (COOH), 6,10-5,90 (1H, -CH=CH-), 5,88-5,70 (1H, -CH=CH-), 5,12-4,95 (1H, N-CH), 4,30-4,15 (2H, N-CH₂), 1,55-1,35 (9H, Boc); (2 rotamery)

Klasickým způsobem racemátového oddělování byly Boc-3,4-dehydroprolin a (+)-dehydroabietylamin krystalizovány jako odpovídající amonná sůl z acetonu a bez další rekrytalizace a po eliminaci aminu byl izolován Boc-(L)-3,4-dehydroprolin

s čistotou 85 % a enantiomerovým poměrem (L):(D) = 96 : 4.

b) 46,2 g terc.-pentoxidu sodného (398,5 mmol) bylo vloženo do 150 ml THF. Potom, při teplotě 10 °C, byli přidáno 32,9 g 2-methoxyethanolu (429,5 mmol). Potom byl přidán po kapkách roztok 50 g Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OH (159,4 mmol) v 100 ml THF takovým způsobem, aby vnitřní teplota nepřekročila 8-10 °C. Směs byla míchána při teplotě 10 °C po dobu dalších 20 hodin po ukončení adice. Přidání 300 ml ledové vody při teplotě 5-10 °C bylo následováno jednou extrakcí 50 ml methyl-terc.-butyletheru a potom okyselením na pH 2 kyselinou chlorovodíkovou. Surový produkt byl extrahován methylenchloridem a po odpaření rozpouštědla byl izolován žlutý olej. Jeho hmotnost byla 40,9 g, ze kterých 18 g byl Boc-(L)-3,4-dehydroprolin, jak bylo určeno HPLC analýzou, kalibrovanou vnějším standardem (počáteční gradient voda (0,1 % H₃PO₄)/acetonitril 70:30; kolona: Prodigy (ODS3) 100A; detekce při vlnové délce 210 nm). Poměr (L):(D) enantiomerů 99:1 byl také určen pomocí HPLC analýzy (hexan/isopropanol 8,75:1,25, 0,1 % HCOOH; kolona: Chiracel OD; detekce při vlnové délce 230 nm). 70 g BOC-(L)-(4-MsO)-Pro-OH (224 mmol) bylo ponecháno reagovat za podobných podmínek. Po extrakci methylenchloridem byl surový produkt přenesen do 220 ml methyl-terc.-butyletheru destilační výměnou rozpouštědla a potom byl přítomný Boc-(L)-3,4-dehydroprolin precipitován jako diethylamoná sůl přidáním 16,5 g diethylaminu (224 mmol). Bylo získáno 23,8 g této soli. (D) enantiomer byl v produktu precipitovaném tímto způsobem nezjistitelný HPLC analytickými metodami uvedenými výše.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, δ v ppm): 5,86-5,67 (2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 4,6-4,5 (N-CH), 4,1-3,9 (N-CH₂), 2,88-2,7 (4H q, NCH_2CH_3), 1,45-1,25 (9H, Boc 2 rotamery), 1,2-1,05 (6H, NCH_2CH_3)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -240,1^\circ$ (C= 1,08, MeOH)

Teplota tání: 130-133 °C

c) 10,52 g bis(trimethylsilyl)amidu sodného (57,4 mmol) bylo vloženo do 25 ml THF a po přidání po kapkách 8,25 g 2-[2-(dimethylamino)ethoxy]ethanolu (62 mmol) v 15 ml THF v průběhu 15 minut s chlazením probíhalo míchání při teplotě okolí po dobu 30 minut. Potom, při teplotě -5 °C, bylo přidáno 7,1 g Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OH (23,0 mmol) rozpuštěného v 15 ml THF po kapkách v průběhu 20 minut a směs byla míchána při teplotě -5 °C po dobu 1 hodiny, při teplotě 0 °C po dobu 2 hodin a při teplotě okolí přes noc. Směs byla potom vlita do 125 g ledové vody a extrahována čtyřikrát methyl-terc.-butyletherem a vodná fáze byla okyselena na pH 2,2 přidáním 60 ml 10 % kyseliny citronové a míchána při teplotě okolí přes noc. Po extrakci reakčního roztoku třikrát methyl-terc.-butyletherem byly shromážděné organické fáze promývány postupně vodou, nasycenou solankou a vodou, sušený nad síranem hořečnatým a koncentrovány za sníženého tlaku. Takto bylo získáno 4,1 g Boc-(L)-3,4-dehydroprolinu jako surového produktu, který byl potom rozpuštěn v 20 ml methyl-terc.-butyletheru a byl přidán po kapkách roztok 1,35 g diethylaminu (18,52 mmolu) v 10 ml methyl-terc.-butyletheru. Potom byl přidáván petrolejový ether do úplné precipitace soli. Produkt byl podtlakově odfiltrován a sušen a tím se získalo 4,0 g Boc-(L)-3,4-dehydroprolinu. Druhá dávka 0,3 g krystalů byla také získána

z matečné tekutiny, takže celkový výtěžek požadovaného produktu byl 66 %.

Příklad 3

Příprava Boc-(D,L)-Pyr-OH:

13 g isopropanolu (215 mmolu) bylo přidáno po kapkách do 8 g 60 % NaH (200 mmolu) v 150 ml DME s chlazením. Po ukončení vývinu H_2 byl při teplotě 0 °C přidán roztok 25 g Boc-(L)-(4-MsO)-Pro-OH (80 mmolu) v 100 ml DME. Po uplynutí 1 hodiny při teplotě 0 °C následovalo zahřívání na teplotu 20 °C po dobu 20 hodin a potom přidání 150 ml vody. Jedna extrakce methyl-terc.-butyletherem byla následována okyselením na pH 2 pomocí kyseliny chlorovodíkové a extrakcí methylenchloridem. Hmotnost produktu byla 17 g. Poměr (L):(D) enantiomerů byl určen pomocí HPLC analýzy (hexan/isopropanol 8,75:1,25, 0,1 % HCOOH; kolona: Chiracel OD; detekce při vlnové délce 230 nm) jako 57:43.

Příklad 4

Enzymatické štěpení Boc-(D/L)-Pyr-OCH₃ na Boc-(L)-Pyr-OH:

5,68 g (25 mmol) Boc-(D/L)-Pyr-OCH₃ v 100 ml fosforečnanového pufru (pH 7,0) a 15 ml THF bylo protřepáváno s 3,12 g @Novozymu 435 při teplotě okolí po dobu 24 hodin. V průběhu této doby bylo pH upraveno zpět na původní hodnotu přidáním 1N NaOH. Postup reakce byl pozorován na základě spotřeby roztoku hydroxidu sodného. Pevná látka byla odfiltrována a filtrát byl upraven na pH 10

přidáním 1N NaOH. Nezareagovaný antipód Boc-(D)-Pyr-OCH₃ byl extrahován směsí ethylacetátem/ether 1:1. pH vodné fáze bylo upraveno na hodnotu 1 pomocí 1N kyseliny chlorovodíkové a produkt Boc-(L)-Pyr-OH byl extrahován třikrát ethylacetátem. 2,14 g produktu bylo získáno a krystalizováno ze směsi toluen/hexan nebo ether/hexan. Po krystalizaci měl produkt optickou rotaci $[\alpha]_D^{22} = -273,8^\circ$ ($c = 1,03$; methanol). (Lit.: $[\alpha]_D^{25} = -272^\circ$ ($c = 1,0$; methanol) J.-U. Kahl, T. Wieland, Liebig's Ann. Chem. 8, (1981) 1445).

Příklad použití 1

Příprava dihydrochloridu H-(L)-Pyr-(6-karboxamido)-3-pikolylamidu:

5,3 ml (30,3 mmolu) DIPEA bylo přidáno po kapkách do 1,5 g surového Boc-Pyr-OH z Příkladu 2 v 30 ml dichloromethanu při teplotě -10°C a po 5 minutách bylo přidáno 1,58 g (7,0 mmol) dihydrochloridu (6-karboxamido)-3-pikolylamidu byl přidán a po dalších 5 minutách 5,7 ml (7,9 mmolu) PPA (50 % roztok v ethylacetátu) v 5 ml dichloromethanu. Reakční směs byla ponechána zahřát se z -10°C na 0°C během 1 hodiny a potom byla zředěna dichloromethanem a promývána postupně nasyceným roztokem NaHCO₃, 5 % kyselinou citronovou a nasycenou solankou. Sušení organické fáze nad Na₂SO₄ a úplné odstranění rozpouštědel vedlo k získání 1,8 g surového Boc-(L)-Pyr (6-karboxamido)-3-pikolylamidu, který byl míchán v 30 ml 0,9 molárního isopropanolového chlorovodíku při teplotě 50°C po dobu 50 minut. Precipitát, který byl takto získán, byl odebrán podtlakovou filtrací, rozpuštěn v malém množství methanolu, precipitován s isopropanolem a znovu odebrán.

Sušení při teplotě 45 °C za sníženého tlaku vedlo k získání 2,0 g dihydrochloridu H-(L)-Pyr-(6-karboxamido)-3-pikolylamidu jako bílého prášku (čistota 95 %);

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ v ppm) : 10,9 a 8,9 (každý 1H, $-\text{NH}_2-\oplus$), 9,77 (t, 1H, CO-NH), 8,60, 8,10 a 8,00 (každý 1H, aromatický H), 8,25 a 7,75 (každý 1H, CO-NH $_2$), 6,03 (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5,10 (1H, N-CH-CO) 4,47 (d, 2H, CH $_2$) 4,00 (2H, CH $_2$).

Příklad použití 2

Příprava hydrochloridu H-(L)-Pyr 4-CN-benzylamidu:

10,0 g surového Boc-Pyr-OH bylo ponecháno reagovat s 6,2 g p-kyanobenzylaminu jako v Příkladu použití 1. Zpracování vedlo k získání 14,7 g surového Boc-(L)-Pyr 4-CN-benzylamidu, který byl míchán v 230 ml 1 molárního isopropanolového chlorovodíku při teplotě 50 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení roztoku na teplotu okolí látka počala pomalu precipitovat. Pevná látka byla odstraněna podtlakovou filtrací. Bylo získáno 3,7 g hydrochloridu H-(L)-Pyr 4-CN-benzylamidu ve formě bílého prášku (čistota 96 %; (L) : (D) větší než 99 : 1).

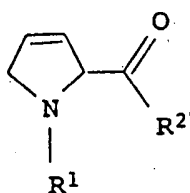
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ v ppm) : 10,9 a 8,9 (každý 1H, $-\text{NH}_2-\oplus$), 7,82 a 7,47 (každý 2H, aromatický H), 6,02 (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5,10 (1H, N-CH-CO), 4,45 (d, 2H, CH $_2$), 4,02 (2H, CH $_2$).

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy derivátů 3-pyrrolin-2-karboxylové kyseliny obecného vzorce I



(I),

ve kterém

R¹ představuje H, C₁-C₆-alkyl, benzyl, benzyl substituovaný na fenyl, allyloxykarbonyl, C₁-C₆-alkyloxykarbonyl, benzyloxykarbonyl, kde benzylový zbytek může být substituován radikály OCH₃, nebo C₁-C₄-alkylkarbonyl nebo

R¹ představuje aminokyselinový zbytek, který je vázán prostřednictvím C konce a může být alkylován nebo acylován na dusíku,

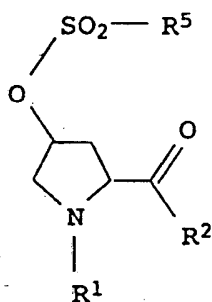
a

R² představuje OH, C₁-C₄-alkyloxy, benzyloxy nebo NR³R⁴,

ve kterém R³ a R⁴ představují, nezávisle na sobě, H, C₁-C₄-alkyl, benzyl, fenyl nebo pyridyl, přičemž je možné, aby aromatické systémy v R³ a R⁴ byly substituovány až třemi stejnými nebo různými substituenty zvolenými ze souborů, zahrnujícího methyl, methoxy, hydroxyl, kyano nebo atom

halogenu,

vyznačující se tím, že zahrnuje eliminaci zbytku kyseliny sulfonové pomocí báze ze sloučeniny obecného vzorce II



(II),

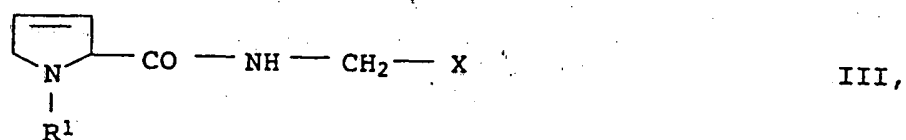
ve kterém R^1 a R^2 mají výše definovaný význam a R^5 představuje C_1 - C_6 -alkyl, benzyl, trifluormethyl, naftyl nebo fenyl, které mohou být nesubstituované nebo substituované radikály zvolenými ze souboru, zahrnujícího methyl, nitro nebo atom halogenu.

2. Způsob podle nároku 1 pro přípravu opticky aktivní 3-pyrrolidin-2-karboxylové kyseliny, **vyznačující se tím,** že zbytek kyseliny sulfonové se eliminuje pomocí báze ze sloučeniny obecného vzorce II, kde R^1 a R^5 mají výše definovaný význam, a R^2 představuje C_1 - C_4 -alkyloxy nebo benzyloxy a opticky aktivní volné kyseliny jsou uvolněny enzymaticky z racemického esteru, získaného tímto způsobem a jsou izolovány, pokud je to vhodné, ve formě amonných solí.

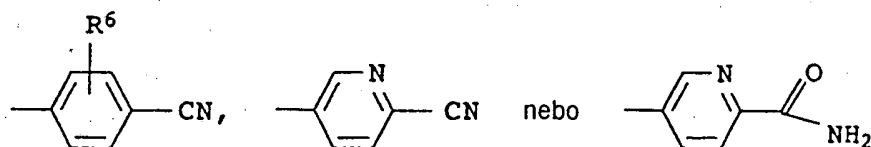
3. Způsob podle nároku 1 pro přípravu opticky aktivní 3-pyrrolidin-2-karboxylové kyseliny, **vyznačující se tím,** že zbytek kyseliny sulfonové se eliminuje pomocí báze ze

sloučeniny obecného vzorce II, kde zbytek karboxylové kyseliny má buď konfiguraci (R) nebo konfiguraci (S), R^1 a R^5 mají výše uvedené významy a R^2 představuje OH, a pokud je to požadováno, takto získané produkty jsou přeměněny na amonné soli pro purifikaci a izolaci.

4. Použití sloučenin, připravených způsobem podle nároku 1, 2 nebo 3 pro přípravu sloučenin obecného vzorce III



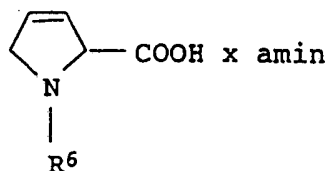
ve kterém R^1 má výše uvedený význam a X představuje



(R^6 = H, CH_3 , OCH_3 , OH nebo atom halogenu).

5. Sloučenina obecného vzorce IV

04.08.99



(IV),

ve kterém R⁶ představuje aminovou ochrannou skupinu a amin je mono-, di- nebo trialkylamin, kde alkylové zbytky obsahují 1-4 atomy uhlíku a mohou být nahrazeny C₅-C₇-cykloalkylovými zbytky.

6. Sloučenina obecného vzorce IV podle nároku 5, ve které R⁶ představuje Boc ochrannou skupinu a amin je diethylamin nebo dicyklohexylamin.

7. Sloučenina podle nároku 5 nebo 6 ve formě D.

8. Sloučenina podle nároku 5 nebo 6 ve formě L.

~~Zastupuje:~~

Dr. Otakar Švorčík