



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

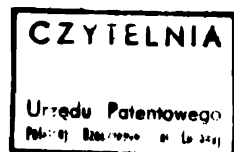
Int. Cl.³ C07C 103/52

Zgłoszono: 17.10.80 (P. 227348)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 21.08.81

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1983



Twórcy wynalazku: Barbara Reszotarska, Elżbieta Masiukiewicz,
Halina Kmiecik-Chmura

Uprawniony z patentu tymczasowego: Wyższa Szkoła Pedagogiczna im. Powstańców Śląskich,
Opole (Polska)

Sposób wytwarzania amidu karbobenzoksy-L-proliloglicyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania amidu karbobenzoksy-L-proliloglicyny, przeznaczonego do wytwarzania peptydów, a w szczególności hormonu luliberyny i jej analogów oraz analogów oksytocyny.

Znane są dotychczas dwie grupy sposobów otrzymywania amidu karbobenzoksy-L-proliloglicyny. Jedna grupa sposobów polega na sprzęganiu aktywowanej formy karbobenzoksy-L-proliny z estrem etylowym glicyny i następnie wymianie estru na amid przez działanie amoniaku. Ogólną wadą tych sposobów jest otrzymywanie produktu zanieczyszczonego, o czym świadczy przede wszystkim temperatura topnienia. Druga grupa sposobów polega na sprzęganiu aktywowanej formy karbobenzoksy-L-proliny bezpośrednio z amidem glicyny. W tej grupie sposobów znanych jest siedem rozwiązań szczegółowych, z których cztery polegają na aktywowaniu karbobenzoksy-L-proliny przy pomocy estrów aktywnych, co wymaga odrębnego etapu syntezy estru aktywnego. Trzy pozostałe sposoby polegają na bezpośrednim aktywowaniu karbobenzoksy-L-proliny. Dwa z nich to aktywowanie przy pomocy dicykloheksylokarbodiimidu, który daje produkt nieczysty, a trzeci to aktywowanie przy pomocy chloromrówczanu izobutyłu w środowisku dimetyloformamidu [Shields J.E., opis patentowy Stanów Zjedn. Ameryki 3 853 834 (1974)].

W tym ostatnim sposobie wytwarzania mieszanego bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutylovym kwasu węglowego prowadzi się w dimetyloformamidzie przez 5 minut, a następnie dodaje się zawiesiny chlorowodorku amidu glicyny z N-metylomorfoliną w dimetyloformamidzie i reakcję prowadzi się przez 2-3 godziny w temperaturze —15°C, a następnie kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymuje się produkt z wydajnością 55% i o temperaturze topnienia 137-142°C.

W trakcie badań stwierdzono, że prowadzenie reakcji aminolizy w temperaturze pokojowej powoduje dysproporcjonowanie bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutylovym kwasu węglowego do symetrycznego bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny i pirowęglału izobutyłu, co w efekcie prowadzi do otrzymania produktów ubocznych w postaci karbobenzoksy-L-proliny i amidu izobutyloksykarbonyloglicyny. Jest to powodem małej wydajności właściwego produktu i zanieczyszczenia go przede wszystkim karbobenzoksy-L-proliną. Stwierdzono dalej, że

można znacznie zmniejszyć zakres reakcji ubocznej i otrzymać właściwy produkt z wysoką wydajnością i o wysokim stopniu czystości.

Istota wynalazku polega na wytwarzaniu amidu karbobenzoksy-L-proliny na drodze kondensacji karbobenzoksy-L-proliny z chloromrówczanem izobutyłu w środowisku dimetyloformamidu i w obecności N-metylomorfoliny do mieszanego bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutylovym kwasu węglowego i następnej aminolizy otrzymanego bezwodnika chlorowodorkiem amidu glicyny w tym samym środowisku i w obecności N-metylomorfoliny, przy czym reakcję aminolizy bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutylovym kwasu węglowego prowadzi się w temperaturze od -10°C do -20°C i w czasie od 18 do 24 godzin.

Sposobem według wynalazku rozpuszcza się karbobenzoksy-L-prolinę w dimetyloformamidzie, roztwór chłodzi do -15°C , dodaje N-metylomorfolinę i chloromrówczan izobutyłu i po 15 minutach, chlorowodorek amidu glicyny i N-metylomorfolinę. Reakcję prowadzi się w ciągu kilkunastu godzin w temperaturze -15°C . Odsąca się osad chlorowodoru N-metylomorfoliny a dimetyloformamid odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszcza się w chlorku metylenu i ekstrahuje 2% kwasem octowym. Warstwę organiczną suszy się bezwodnym Na_2SO_4 i rozpuszczalnik odparowuje od oleistej pozostałości, którą krystalizuje się z octanu etylu. Otrzymuje się produkt z 84% wydajnością teoretyczną o temperaturze topnienia $145,5-146^{\circ}\text{C}$.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się produkt z wysoką wydajnością o wyjątkowo wysokiej czystości, o czym świadczy podana wyżej temperatura topnienia a także chromatograficzna jednorodność w czterech różnych typach układów rozpuszczalników. Tę wydajność i czystość produktu uzyskuje się dzięki prowadzeniu reakcji w niskiej temperaturze, co zapobiega dysproporcjonowaniu mieszanego bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutylovym kwasu węglowego.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady stosowania.

Przykład I. 14,97g (60 mM) karbobenzoksy-L-proliny rozpuszczono w 30 mL dimetyloformamidu, roztwór ochłodzono do temperatury -15°C i dodano 6,618 mL (60 mM) N-metylomorfoliny oraz 7,722 mL (60 mM) chloromrówczanu izobutyłu. Po 15 minutach reakcji dodano 6,632g (60 mM) chlorowodoru amidu glicyny i 6,618 mL (60 mM) N-metylomorfoliny. Po 18 godzinach reakcji w temperaturze -15°C odsączono chlorowodorek N-metylomorfoliny a dimetyloformamid odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 200 mL chlorku metylenu i ekstrahowano 3×35 mL 2% kwasu octowego. Warstwę chlorku metylenu suszono bezwodnym Na_2SO_4 i rozpuszczalnik odparowano. Pozostałość krystalizowano z 500 mL octanu etylu. Otrzymano 15,27g produktu, co stanowi 84% wydajności teoretycznej. Produkt miał następującą charakterystykę:

t.top. = $145,5-146^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}^{20,8}} = -41,12^{\circ}$ (C 1, metanol), $[\alpha]_{\text{D}^{20,8}} = -29,7^{\circ}$ (C 1, dimetyloformamid)

Analiza dla wzoru: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ M = 305,33

obliczone: C 59,00%; H 6,27%; N 13,76%

znalezione: 59,18%; 6,03%; 13,87%

Współczynniki R_f

chloroform/metanol/dioksan/stęż. amoniak = 6:3,5:2,5:0,5; $R_f = 0,75$

n-butanol/kwas octowy/woda = 4:1:5; $R_f = 0,67$ etanol/woda = 7:3; $R_f = 0,74$

n-butanol/kwas octowy/pirydyna/woda = 5:1:4:1; $R = 0,70$

Przykład II. 12,47g (50 mM) karbobenzoksy-L-proliny rozpuszczono w 25 mL dimetyloformamidu, roztwór ochłodzono do temperatury -15°C i dodano 5,515 mL (50 mM) N-metylomorfoliny oraz 6-435 mL (50 mM) chloromrówczanu izobutyłu. Po 15 minutach reakcji dodano 5,526g (50 mM) chlorowodoru amidu glicyny i 5,515 mL (50 mM) N-metylomorfoliny. Po 14 godzinach reakcji w temperaturze -10°C z mieszaniny reakcyjnej wyodrębniono produkt tak jak opisano w przykładzie I. Otrzymany dipeptyd miał taką samą charakterystykę jak otrzymany według przykładu I.

Przykład III. 2,495g (10 mM) karbobenzoksy-L-proliny rozpuszczono w 5 mL dimetyloformamidu, roztwór ochłodzono do temperatury -15°C i dodano 1,103 mL (10 mM) N-metylomorfoliny oraz 1,287 mL (10 mM) chloromrówczanu izobutyłu. Po 15 minutach reakcji dodano 1,105g (10 mM) chlorowodoru amidu glicyny i 1,103 mL N-metylomorfoliny. Po 24

godzinach reakcji w temperaturze -20°C z mieszaniny reakcyjnej wyizolowano produkt tak jak opisano w przykładzie I, a otrzymany dipeptyd miał taką samą charakterystykę jak produkt otrzymany według przykładu I.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania amidu karbobenzoksy-L-proliloglicyny na drodze kondensacji karbobenzoksy-L-proliny z chloromrówczanem izobutyłu w środowisku dimrtyloformamidu i w obecności N-metylomorfoliny do mieszanego bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutyłowym kwasu węglowego i następnej aminolizy otrzymanego półproduktu chlorowodorkiem amidu glicyny w tym samym środowisku i w obecności N-metylomorfoliny, **znamienny tym**, że reakcję aminolizy bezwodnika karbobenzoksy-L-proliny z monoestrem izobutyłowym kwasu węglowego prowadzi się w temperaturze od -10°C do -20°C w czasie od 18 do 24 godzin.