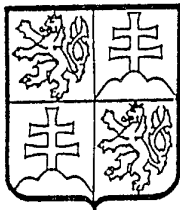


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277132

(21) Číslo přihlášky : 5134-90
(22) Přihlášeno : 22.10.90
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 13.05.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :
C 07 D 233/74

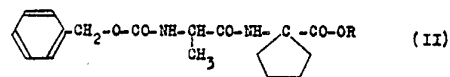
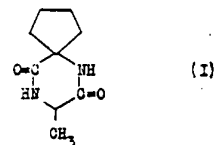
(73) Majitel patentu : Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, s.p., Praha, CS

(72) Původce vynálezu : Štunc Antonín ing., Praha, CS;
Kasafírek Evžen ing. CSc., Praha, CS;

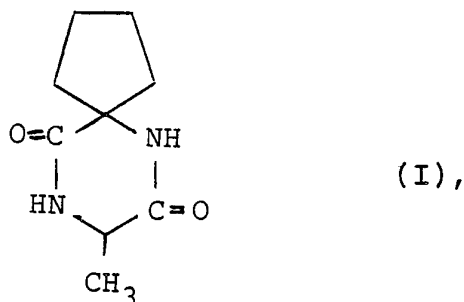
(54) Název vynálezu : Způsob výroby cyklo(L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarbonylu)

(57) Anotace :

Způsob výroby cyklo(L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarbonylu) vzorce I z esteru benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarboxylové kyseliny obecného vzorce II, kde R znamená metyl nebo etyl, katalytickým hydrogenolytickým odštěpením benzyloxykarbonylové skupiny a následující cyklizací. Postup se vyznačuje především využitím tlakové katalytické hydrogenolýzy s optimálními tlaky vodíku do 2 MPa za užití katalyzátoru Pd na uhlí, když v organickém rozpouštědle, nejlépe metanolu, se využívá vysoké koncentrace výchozí surové látky II ve formě odparku rozpuštěném na koncentraci až 60 % hmot. Po odstranění katalyzátoru se provádí cyklizace za laboratorních nebo zvýšených teplot po dobu několika hodin až dnů.



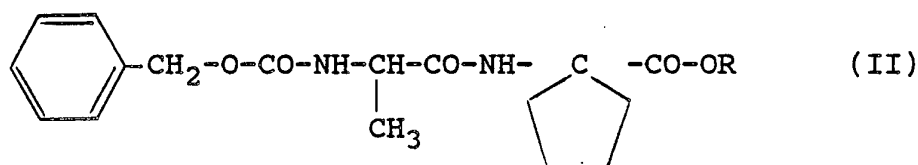
Vynález se týká způsobu výroby cyklo(L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarbonylu) vzorce I



známé látky, jiný název je 8(S)-metyl-6,9-diazaspiro/4,5/-dekan-7,10-dion nebo Alaptid. Látka a její terapeutické použití je chráněno v ČSFR a zahraničí (ČS 231 227; 231 231; 260 899; EP 268 868-A; ČS 276 270).

Alaptid výrazně stimuluje růst zdravých lidských diploidních buněk. Těto vlastnosti lze s úspěchem využít všude tam, kde se jedná o regeneraci poškozených buněk a tkání, tedy jako léčivo při popáleninách, kožních lézích, gastrointestinálních chorobách, poruchách paměti atd.

Látka vzorce I je dostupná obecně známými způsoby přípravy cyklických dipeptidů, derivátů 2,5-piperazindionu. V závěrečných stupních syntézy se z benzyloxykarbonyl-L-alaninu a alkylesteru, nejlépe metyl- nebo etylesteru kyseliny chlormravenčí v přítomnosti báze, například N-etyl-piperidinu, připraví směsný anhydrid, který dále reaguje s metyl- nebo etylesterem kyseliny 1-amino-1-cyklopentankarboxylové. Zpracováním reakční směsi se získá ester benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarboxylové kyseliny obecného vzorce II



(R značí metyl nebo etyl), který se ani neizoluje ani necharakterizuje a se kterým se dále pracuje v podobě odparku reakční směsi. Před závěrečným stupněm, tj. cyklizací, se odstraní chránicí benzyloxykarbonylová skupina a získaný produkt, opět ve formě nečistěného a necharakterizovaného odparku, se za acidobázické katalýzy cyklizuje při zvýšené teplotě, obvykle při teplotě varu reakční směsi, v prostředí netečného rozpouštědla, s výhodou v toluenu. Teprve konečný produkt, látka vzorce I, se čistí krystalizací a charakterizuje fyzikálními konstantami.

Zkušenost ukázala, že problematickým stupněm závěru syntézy látky vzorce I je odstraňování chránicí benzyloxykarbonylové skupiny (dále označena jako Z-skupina). Odstraňování je realizovatelné několika známými způsoby, jako acidolýzou nebo redukcí, například sodíkem v kapalném amoniaku. Při syntéze látky vzorce I bylo používáno zejména acidolýzy bromovodíkem v kyselině octo-

vé, poskytující ester dipeptidu obecného vzorce II ve formě soli. Ester se po deionizaci cyklizoval. Popsaný způsob byl časově i materiálově náročný, málo efektivní a nevhodný pro výrobu ve větším měřítku.

Výhodnější metody pro odstraňování Z-skupiny jsou metody hydrogenolytické (Ber. 65, 1192, (1932), Chemistry of Amino Acids Vol. 2, J. Wiley 1961). Za katalýzy paládiem se účinkem vodíku odštěpuje Z-skupina ve formě toluenu a kysličníku uhličitého. Metoda beztlakové hydrogenolýzy, kdy reaktorem probublává vodík a v odplynů se odvádí kysličník uhličitý, byla v chemii peptidů mnohokrát využita (Houben-Weyl, Methoden der org. Chem. 15/1, 51 (1974); EP 27 319).

Použití beztlakové hydrogenolýzy pro odstranění Z-skupiny z látky vzorce II je možné, ovšem výchozí koncentrace této látky musí být nízká a reakční doby jsou dlouhé. Za těchto podmínek však již probíhá cyklizace na látku vzorce I, která je však v reakční směsi velmi málo rozpustná, vylučuje se a při izolaci se musí z katalyzátoru pracně odstraňovat. Dalšími nevýhodami beztlakové hydrogenolýzy jsou nesnadná indikace ukončení reakce a problémy s provozem a konstrukcí průtočných reaktorů.

Nověji byly pro jiné typy peptidů publikovány hydrogenolytické metody pomocí přenosu vodíku z pomocných látek. Pomocí paládiových katalyzátorů se z těchto látek, například z cyklohexenu, cyklohexadienu, kyseliny mravenčí, hydrazinu, mravenčanu amonného atd., získává vodík "in situ" (J. Chem. Soc. Perk. I, 490 (1977); J. Org. Chem. 433 4149, (1978), 44 3442 (1979); Synthesis 1978, 751, 1980, 929). Tyto metody mají však opět některé nevýhody: používání pomocných látek a jejich odstraňování z reakčních směsí, velké množství katalyzátoru, nízké koncentrace výchozích látek (méně než 10 % hmot.), obtížné sledování průběhu reakce (například pomocí chromatografie).

Obecně byly pro hydrogenolýzu s přenosem vodíku nebo pro beztlakovou reakci se Z-skupinou použity katalyzátory na bázi kobaltu (DD 157 094) nebo paládia na nosiči z celulózy (DD 209 196).

Použití vyššího tlaku vodíku než atmosférického, ale ještě poměrně nízkého (do 0,35 MPa), s nízkou koncentrací výchozí látky a s dlouhou reakční dobou, bylo nověji u syntéz jiných druhů peptidů také popsáno (USA 4 454 065; EP 27 260).

Byla sledována hydrogenolýza N-karbobenzoxypřyl-argininu na paládiovém katalyzátoru při tlacích vodíku 1 MPa, při teplotách 55 až 75 °C a koncentracích pouze do 14 mmol na litr. Reakce trvala více než 9 h, výtěžek nepřesáhl 69 % teorie. Při použití absolutního etanolu jako rozpouštědla nastávala také redukční alkylation za vzniku N-etylóvého produktu (Izv. Akad. nauk Latv. SSR 1984 (2), 244).

Zmíněné potíže a nevýhody podnítily především studium nespolehlivé metody odstraňování Z-skupiny z látky obecného vzorce II

pomocí hydrogenolýzy. Současně byly zkoumány i parametry závěrečné cyklizace na produkt vzorce I. Poznatky, získané tímto studiem, umožnily vypracovat podstatně zjednodušený a zlepšený způsob výroby Alaptidu, látky vzorce I podle vynálezu, jehož princip spočívá v tom, že se jako výchozí suroviny pro hydrogenolýzu používá produktu reakce směsného anhydridu, vzniklého z Z-L-alaninu a alkylesteru, například metyl- nebo etylesteru kyseliny chlormravenčí, s metyl- nebo etylesterem kyseliny l-amino-1-cyklopentankarboxylové, ve formě odparku obsahujícího ester Z-L-alanyl-l-amino-1-cyklopentankarboxylové kyseliny obecného vzorce II, rozpuštěného v netečném organickém rozpouštědle, například v metanolu nebo etanolu, na roztok o koncentraci 10 až 60 % hmot., s výhodou 20 až 40 % hmot., který se hydrogenolyzuje za tlaku vodíku 0,1 až 10 MPa, s výhodou 0,2 až 1,5 MPa, při teplotě 0 až 80 °C, s výhodou 10 až 30 °C, za přítomnosti katalyzátoru, například paladia na uhlí, po ukončení hydrogenolýzy a po odstranění katalyzátoru se provádí cyklizace při teplotě 0 až 70 °C, po dobu 2 h až 20 dnů, potom se vyloučená látka vzorce I izoluje.

V některých případech je účelné, když se v průběhu hydrogenolýzy reaktor alespoň jednou odplyní a po naplnění vodíkem na původní tlak se v hydrogenolýze pokračuje až do ukončení.

Způsob podle vynálezu umožňuje práci s vysokými koncentracemi výchozí látky obecného vzorce II tím, že se v reaktoru udržuje převaha parciálního tlaku vodíku nad parciálním tlakem vznikajícího kysličníku uhličitého. Může se proto hydrogenovat za vysokých tlaků vodíku (nad 2 MPa); není-li k dispozici vhodný autokláv, lze pracovat i při nízkých tlacích do 0,6 MPa, přičemž se zařízení v průběhu hydrogenolýzy alespoň jednou odplyní a potom se opět plní vodíkem. Odplyněním se reakční směs zbavuje kysličníku uhličitého. Při diskontinuálním režimu se mohou tlakové poměry řídit také stupněm plnění autoklávu.

Při dostatečné rychlosti hydrogenolýzy, přestože se užívá vysoké koncentrace výchozí látky obecného vzorce II, nenastává v průběhu reakce významná cyklizace na látku vzorce I, která dříve značně komplikovala práci před závěrečným stupněm. Katalyzátor je možno bez problémů odfiltrovat a produkt hydrogenolýzy zpracovat hladce za zvolených podmínek cyklizace na Alaptid.

Způsob podle vynálezu umožňuje dále účelné využití dalších vhodných známých podmínek, které se týkají hydrogenolýz, respektive hydrogenací. Je možno vycházet ze surovin různé kvality, výhodné jsou samozřejmě suroviny čisté, deaktivace katalyzátoru je potom nízká. Pro exotermní průběh se zajišťuje chlazení, lze také reagovat při neizotermním režimu, s výhodou při teplotách do 30 °C. Množství a aktivita katalyzátoru (vedle teploty a tlaku a dalších podmínek) určuje reakční rychlost. Nejvhodnější je paladium na uhlí, v množství 1 až 100 % hmot., vztaženo na hmotnost výchozí látky, obvykle 1 až 10 % hmot.; například při obsahu paladia 1 až 10 % hmot. na nosiči. Katalyzátor je možno také vytvořit "in situ" v reakční směsi z aktivního uhlí a chloridu paladnatého. Katalyzátor je možno opakovaně používat, což je dal-

ší ekonomická výhoda způsobu podle vynálezu. Podle technologických podmínek lze volit trvání hydrogenolýzy od 10 minut až do 3 h. Dostatečným mícháním se zajistí, že rychlost reakce není limitována přenosem hmoty a probíhá v kinetickém reakčním režimu. Průběh hydrogenolýzy lze sledovat manometricky. Při způsobu podle vynálezu lze používat k hydrogenolýze obvyklých rozpouštědel, jako jsou alkoholy, uhlovodíky, dimetylformamid, nebo jejich směsi. Účelná jsou taková rozpouštědla, ve kterých je produkt hydrogenolýzy dobře rozpustný.

Při studiu optimálních podmínek cyklizace produktu hydrogenolýzy na látku vzorce I bylo s překvapením zjištěno, že na rozdíl od jiných známých způsobů cyklizace dipeptidů, kdy jsou nutné vyšší teploty (100 °C) a acidobázická katalýza, je možno využít poměrně vysoké rychlosti spontánní cyklizace za laboratorní teploty, obvykle při 15 až 30 °C. Do značné míry to usnadňuje vysoká koncentrace produktu v roztoku po hydrogenolýze. Příznivě se projevuje i skutečnost, že Alaptid krystaluje ve vysoké čistotě a je málo rozpustný, zatímco nečistoty jsou dobře rozpustné a zůstávají v matečném louhu.

Bylo nalezeno, že při zachování koncentrací doporučených pro hydrogenolýzu, poskytuje spontánní cyklizace při laboratorní teplotě po 1 dni výtěžek kolem 50 % teorie, po 2 dnech kolem 75 % teorie, po 4 dnech asi 90 % a po 20 dnech je výtěžek téměř kvantitativní. Výhodou tohoto provedení cyklizace je jednoduchost, nízká pracnost, není třeba dalších surovin, energií a zařízení jako při acidobázické cyklizaci při zvýšené teplotě.

Reakční směs po hydrogenolýze, zbavená katalyzátoru, se shromažďuje v zásobníku, kde proběhne samovolná cyklizace a krystalizace. Po zvolené době se podle hustoty suspenze izoluje Alaptid, i vícekrát a z matečných louhů se podle provozních možností destilací získá rozpouštědlo k opětnému použití. Odparek se zpracuje na druhou frakci produktu.

Cyklizace a krystalizace produktu v zásobníku při vhodném uspořádání nebrzdí průběh periodické výroby, protože v závěrečných stupních syntézy může být limitujícím faktorem výkon reaktorů pro kondenzaci aminokyselin a zejména pro hydrogenolýzu. Když se izoluje Alaptid po poměrně krátké době stání v zásobníku, nenastávají ztráty produktu. V první fázi se získá méně produktu a v druhé fázi se získá o to více při zpracování matečných louhů, ze kterých lze regenerovat rozpouštědla.

Ukončení syntézy termickou cyklizací je také možné, rychlost procesu se zvýší, na závěr je vhodné i oddestilování metanolu. Například cyklizace je prakticky kvantitativní, když se při teplotě 65 °C míchá roztok po hydrogenolýze 2 h a oddestiluje se metanol.

Ve výrobním procesu se s výhodou může využít kombinace obou krajních způsobů výše popaných. Například filtrát po hydrogenolýze se zahřívá, po několika hodinách se podle konzistence suspenze izoluje první podíl produktu, matečné louhy se vrátí do reaktoru

a ohřev se spojuje s oddestilováním metanolu (například za vakua), vyloučený produkt se opět izoluje atd.

V případě potřeby lze získané produkty čistit známými způsoby, například krystalizací s 50 % vodného etanolu.

Předpokladem průmyslové výroby Alaptidu je především provedení hydrogenolýzy podle vynálezu, přičemž na tento stupeň navazuje zdokonalený způsob cyklizace. Postup se projevuje snížením pracnosti, spotřeby surovin a energií, zvýšením produktivity bez investičních nároků a zlepšením pracovních podmínek a prostředí. Odpadá deionizace, obtížné látky (bromovodík, chloroform, amoniak) jsou eliminovány, nevznikají ekologicky závadné odpady. Dosahuje se výtěžků přes 70 % teorie (vztaženo na výchozí Z-Alanin) ve srovnání s nejvýše 40 % teorie, dosahovanými při acidolytickém odštěpení Z-skupiny.

Při způsobu podle vynálezu představují tři závěrečné stupně syntézy látky vzorce I jeden technologický celek, protože se izoluje a fyzikálními konstantami charakterizuje až konečný produkt cyklizace.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

K roztoku 100,5 g (0,45 mol) benzyloxykarbonyl-L-alaninu a 63 ml N-etylpiperidinu v 1 litru metylénchloridu, ochlazeném na -30 °C, bylo za míchání přidáno 45 ml chlormravenčanu etylnatého a po 15 min. míchání při teplotě -10 °C byl přidán roztok metylesteru kyseliny 1-amino-1-cyklopentankarboxylové, uvolněného z 81 g (0,45 mol) odpovídajícího hydrochloridu přidavkem 63 ml N-etylpiperidinu v 700 ml metylénchloridu. Po smíchání obou roztoků byla reakční směs míchána 30 min. při teplotě -10 °C a 2 h při teplotě místnosti, potom vytřepána 1 M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou a odpařena ve vakuu. Nekrystalický odparek byl znovu rozpuštěn ve 220 ml metanolu a 50 ml toluenu a opět odpařen.

Získaný odparek (asi 150 g), tj. surová látka obecného vzorce II, byl rozpuštěn ve 400 ml metanolu a roztok byl rozdělen na 4 podíly.

První podíl byl nasazen do autoklávu, přidány 3 g katalyzátoru 5% Pd/C ve formě suspenze ve 30 ml toluenu a po výplachu autoklávu dusíkem a vodíkem byla zahájena hydrogenolýza při počátečním tlaku vodíku 1 MPa. Při poklesu tlaku na 0,3 MPa byl autokláv odplyněn a opět natlakován vodíkem na 1 MPa. Tento zásah byl opakován ještě jednou. Hydrogenolýza trvala 50 minut.

Katalyzátor byl odfiltrován a použit pro zpracování zbylých podílů zásobního roztoku látky vzorce II, za stejných podmínek jak výše popsáno, s výjimkou čtvrtého podílu.

Ten byl zpracován obdobně, jen s tím rozdílem, že hydrogenolýza probíhala za tlaků 0,4 až 0,15 MPa, přičemž odplynění autoklávu a plnění vodíkem na výchozí tlak 0,4 MPa bylo opakováno 5x.

Spojené filtráty po hydrogenolýzách byly míchány 2 h při 60 °C, metanol byl za mírného vakua odpařen při 55 °C. Odparek byl suspendován ve 150 ml metanolu a krystalický produkt byl odfiltrován. Výtěžek byl 53 g (65 % teorie, vztaženo na Z-Alanin) látky vzorce I, t. t. 289 až 291 °C, $\alpha_D^{20} = -21^\circ$ (c 0,2; metanol).

Příklad 2

Surový metylester kyseliny benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentakarboxylové (vzorec II, R = metyl), získaný podle příkladu 1 ve formě odparku, byl rozpuštěn v množství 50 g s metanolem na objem 68 ml roztoku.

Po přidavku 2 g 5% Pd/C katalyzátoru, 20 ml metanolu a 20 ml toluenu bylo hydrogenolýzováno za teploty 50 °C, za počátečního tlaku vodíku 2 MPa. Po poklesu tlaku na 1 MPa byl autokláv odplyněn a po natlakování na 2 MPa vodíkem se pokračovalo v hydrogenolýze, celkem se reagovalo 15 min.

Po odfiltrování katalyzátoru probíhala ve filtrátu samovolně cyklizace za laboratorní teploty po dobu 2 dnů. Po odfiltrování, promytí metanolem a usušení bylo získáno 14,2 g Alaptidu o stejných vlastnostech jako v příkladu 1.

Příklad 3

Postup podle příkladu 1 s tím rozdílem, že se vycházelo z 1,5 kg Z-Alaninu a z ekvivalentních množství dalších komponent. Bylo získáno 2,45 kg odparku metylesteru kyseliny benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarboxylové, který byl rozpuštěn v metanolu na objem 3,4 litrů a roztok byl rozdělen na 5 podílů.

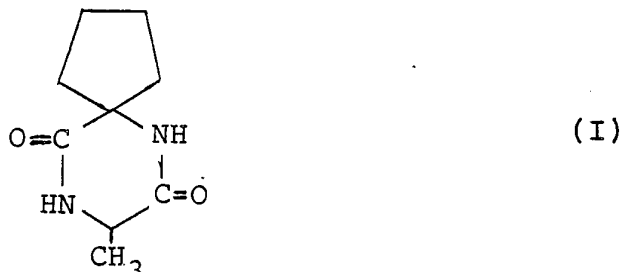
Do třílitrového autoklávu byl nasazen první podíl tohoto roztoku, přidáno 50 g 5% Pd/C katalyzátoru, 200 ml metanolu a 300 ml toluenu a hydrogenolýzovalo se za teploty 18 až 22 °C 1 h. Počáteční tlak vodíku byl 2 MPa, po poklesu na 1 MPa byl autokláv odplyněn a opět tlakován vodíkem na 2 MPa. Po odfiltrování byl katalyzátor použit pro 4 další hydrogenolýzy za stejných podmínek.

Roztoky po odfiltrování katalyzátoru byly shromažďovány v zásobníku, kde probíhala 8 dnů za laboratorní teploty samovolná cyklizace a krystalizace: Po odsátí, promytí metanolem a usušení bylo získáno 890 g (73 % teorie) Alaptidu, t. t. byla 289 až 291 °C, $\alpha_D^{20} = -21,2$ (c 0,2, metanol).

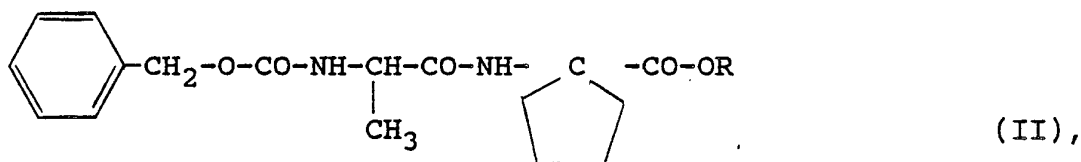
Z matečného louhu byla jednak destilací regenerována rozpouštědla, jednak byl získán II. podíl Alaptidu ve výtěžku 90 g, $\alpha_D^{20} = -20,0$ (c 0,2, metanol).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby cyklo(L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarbonylu) vzorce I



z esteru benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarboxylové kyseliny vzorce II



ve kterém R značí metyl nebo etyl, odstraněním benzyloxykarboxylové chránicí skupiny a následující cyklizací, vyznačující se tím, že se jako výchozí suroviny používá produktu reakce směsného anhydridu, vzniklého z benzyloxykarbonyl-L-alaninu a alkylesteru, například metyl- nebo etylesteru kyseliny chlormravenčí s metyl- nebo etylesterem kyseliny 1-amino-1-cyklopentankarboxylové, ve formě odparku obsahujícího ester benzyloxykarbonyl-L-alanyl-1-amino-1-cyklopentankarboxylové kyseliny obecného vzorce II, rozpuštěného v netečném organickém rozpouštědle, například v metanolu nebo etanolu na roztok o koncentraci 10 až 60 % hmot., s výhodou 20 až 40 % hmot., který se hydrogenolyzuje za tlaku vodíku 0,1 až 10 MPa, s výhodou 0,2 až 1,5 MPa, při teplotě 0 až 80 °C, s výhodou 10 až 30 °C, za přítomnosti katalyzátoru, například paladia na uhlí, po ukončení hydrogenolýzy a po odstranění katalyzátoru se provádí cyklizace při teplotě 0 až 70 °C po dobu 2 h až 20 dnů, potom se vyloučená látka vzorce I izoluje.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se v průběhu hydrogenolýzy reaktor alespoň jednou odplyní a po natlakování vodíkem na původní tlak se v hydrogenolýze pokračuje až do ukončení.

Konec dokumentu
