



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **226 014 A1**4(51) C 12 P 13/00
C 12 P 13/14
C 12 P 13/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 264 460 3	(22)	28.05.84	(44)	14.08.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Beyermann, Michael, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bienert, Michael, Dr. rer. nat.; Jakubke, Hans-Dieter, Prof. Dr. rer. nat.; Przybylski, Monika, DD

(54) Verfahren zur Herstellung der ω -tert. Butylester von Aminodicarbonsäuren

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von selektiv in der Seitenkette geschützten α -Aminodicarbonsäurederivaten durch enzym-katalysierte Hydrolyse der entsprechenden α -, ω -Di-tert. Butylesterderivate. Derartige selektiv geschützte Derivate der Asparaginsäure und Glutaminsäure finden Anwendung bei der Synthese von Peptiden und damit in der pharmazeutischen Industrie.

Verfahren zur Herstellung der ω -tert. Butylester von Aminodicarbonsäuren

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von selektiv ω -geschützten Asparaginsäure- und Glutaminsäurederivaten mittels enzymatischer Hydrolyse entsprechender α -, ω -Diesterderivate. Derartige selektiv geschützte Derivate der Asparaginsäure und Glutaminsäure finden Anwendung bei der Synthese von Peptiden und damit in der pharmazeutischen Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Synthese asparaginsäure- oder glutaminsäurehaltiger Peptide erfordert den selektiven Schutz der Seitenkettenfunktion gegenüber der für die Peptidkupplung notwendigerweise freien α -Carboxylgruppe. Als Schutzgruppen kommen dabei der Benzylester oder der tert.-Butylester zur Anwendung. Während die Darstellung von ω -Benzylestern von Asp und Glu durch chemische Methoden mit guten Ausbeuten in einer einstufigen Reaktion realisierbar ist, (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Vol. 15/I Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, S. 645 ff.) ist die Darstellung entsprechender ω -tert. Butylester bedeutend aufwendiger. In der Praxis finden zwei Varianten Anwendung (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Vol. 15/I Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, S. 649 ff.):

- 1.) Ausgehend von N ^{α} -geschützter Aminosäure (Z-Asp bzw. Z-Glu) wird über das Anhydrid der α -Methylester hergestellt, der mittels Isobuten in der Seitenkette in den tert. Butylester überführt wird. Die anschließende alkalische Hydrolyse des α -Methylesters und hydro-

geholytische Abspaltung der Aminoschutzgruppe führt zum gewünschten ω -tert. Butylester.

2. N^{α} -Benzyloxycarbonyl-Asparagin bzw. -Glutamin wird in den Methylester überführt. Anschließend erfolgt die Abspaltung des Seitenkettenamides. Durch Umsetzung mit Isobuten wird die Seitenkettenfunktion in den tert. Butylester überführt. Die sich anschließende Abspaltung der N^{α} - und C^{α} -Schutzgruppen entsprechend 1. führt zum gewünschten ω -tert. Butylderivat.

Nach Birr (EP-PS 006 856) lassen sich ω -tert. Butylester der Asparaginsäure und der Glutaminsäure durch direkten Umsatz mit Isobuten und anschließender Reinigung herstellen. Dabei werden die unterschiedlichen Veresterungsgeschwindigkeiten an der α - und der ω -Carboxylgruppe ausgenutzt. Bei diesem Verfahren ist der gebildete ω -Monoester stets entsprechend dem Verhältnis der Bildungsgeschwindigkeiten von α - und ω -Monoester mit α -Monoester verunreinigt. Für die weitere Verwendung des ω -tert. Butyl-monoesters in der Peptidsynthese muß jedoch eine Verunreinigung mit α -tert. Butylmonoester ausgeschlossen werden können. Es ist deshalb eine aufwendige quantitative Trennung der hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften sehr ähnlichen α - und ω -Monoester erforderlich.

Ein analoges Verfahren zur Herstellung von ω -tert. Butylester der Glutaminsäure durch direkten Umsatz von Glutaminsäure mit Essigsäure-tert.-butylester wurde bereits 1963 von Taschner et al. (Taschner, E. et al., Ann. Chem. 663, (1963) 188) beschrieben. In der peptidchemischen Praxis wird zur Gewährleistung der Isomerenfreiheit des ω -tert. Butylesters dem zwar aufwendigeren, aber dafür sicheren, Verfahren über den temporären Schutz der α -Carboxylgruppe der Vorrang gegeben, um die entsprechende Reinheit der zu synthetisierenden Peptide zu sichern. Neben den o.g. chemischen Verfahren sind keine enzymatischen Verfahren zur Darstellung von ω -tert. Butylesterderivaten bekannt.

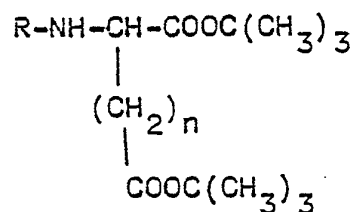
Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, ω -tert. Butylester von Asparaginsäure und Glutaminsäure sowie deren N-Acylderivate unter Inanspruchnahme weniger Schritte und unter Ausschluß der Möglichkeit einer Verunreinigung mit dem entsprechenden α -tert. Butylester bzw. dessen N-Acylderivat in guten Ausbeuten herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem mit geringem Aufwand α -, ω -Di-tert.-Butylesterderivate selektiv in die ω -Monoesterderivate umgesetzt werden.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß die durch Umsetzung in Isobuten/Schwefelsäure einfach und in hohen Ausbeuten herstellbaren α -, ω -Di-tert. Butylesterderivate der allgemeinen Formel I, in der R = H, Acyl und n = 1 oder 2 bedeuten, unter Einwirkung von Enzymen selektiv in die ω -Monoesterderivate überführt werden. Die Selektivität der Hydrolyse wird durch die Selektivität der Enzyme gewährleistet.



I

Im Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse wird der entsprechende ω -tert. Butylester erhalten, der bei unvollständiger Hydrolyse lediglich mit Diester verunreinigt sein kann. Dieser kann jedoch, ebenso wie das Enzym, auf einfache Weise abgetrennt werden. Zur Hydrolyse können in diesem Zusammenhang Enzyme oder enzymhaltige Mixturen mit hinreichender Esteraseaktivität gegenüber Substraten der allgemeinen Formel I verwendet werden. Besonders bewährt hat sich der Einsatz leicht zugänglicher proteolytischer Enzyme, wie α -Chymotrypsin oder Pronase P. Hinsichtlich der Reinheit der Enzyme sollten

lediglich Verunreinigungen vermieden werden, die die Produktisolierung erschweren. So können u.a. auch durch die Verwendung von entfettetem Schweine- und Rinderpankreas (Pankreatin) gute Resultate erzielt werden. Darüber hinaus lassen sich bei analogem Vorgehen auch die ω -Benzylester von Asparaginsäure oder Glutaminsäure bzw. deren N-Acylderivate durch enzymatische Hydrolyse der entsprechenden α -, ω -Dibenzylesterderivate herstellen.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

100 mg H-Glu(OBu^t)-OBu^t, gelöst in 5 ml 0,05 M TRIS/HCl - 0,005 M CaCl₂, pH 7,5, werden mit 20 mg α-Chymotrypsin versetzt. Der Ansatz wird 8 Tage bei 37 °C gerührt. Die quantitative Auswertung der dünnschichtchromatographischen Untersuchung (QTLC) des Ansatzes (auf KG 60 - Glasfertigplatten der Fa. Merck nach Entwicklung mit Ninhydrin oder Benzidin) zeigte eine 91%ige Bildung von H-Glu(OBu^t)-OH an. Zur Isolierung des gewünschten Monoesters wird der eingeeengte Ansatz über eine mit Kieselgel 60 gefüllte Säule (2 x 10 cm) in Chloroform mit steigendem Ethanolgehalt chromatographiert. Es wurden 3 ml-Fractionen gesammelt. Aus den Fractionen 53 - 61 wurden 3,2 mg H-Glu(OBu^t)-OBu^t und aus den Fractionen 85 - 102 80,1 mg H-Glu(OBu^t)-OH durch Einengen i.V. gewonnen.

Beispiel 2:

10 mg H-Glu(OBu^t)-OBu^t, gelöst in 1 ml 0,05 M TRIS/HCl - 0,005 M CaCl₂, pH 7,5, werden mit 5 mg Pankreatin versetzt. Nach 3 Tagen Rühren bei 37 °C zeigte die QTLC 56%, nach 5 Tagen 68 % und nach 10 Tagen 74 % gebildeten H-Glu(OBu^t)-OH.

Isolierung wie im Beispiel 1.

Beispiel 3:

100 mg H-Glu(OBu^t)-OBu^t, gelöst in 5 ml 0,05 M TRIS/HCl - 0,005 M CaCl₂, pH 7,5, werden mit 20 mg Pronase P versetzt und der Ansatz bei 37 °C gerührt. Nach 20 h werden weitere 10 mg Pronase P zugesetzt und noch 1 h gerührt. Die QTLC ergab eine 93%ige Bildung von H-Glu(OBu^t)-OH.

Beispiel 4:

43 mg H-Asp(OBu^t)-OBu^t, gelöst in 5 ml 0,05 M TRIS/HCl - 0,005 M CaCl₂, pH 7,5, werden mit 12 mg Pronase P versetzt. Nach 14 h Rühren bei 37 °C konnte eine 90%ige Bildung von H-Asp(OBu^t)-OH nachgewiesen werden (QTLC).

Beispiel 5:

120 mg Z-Glu(OBu^t)-OBu^t werden in 5 ml 0,05 M TRIS/HCL - 0,005 M CaCl₂, pH 7,5, suspendiert. 15 mg Pronase P werden zugesetzt und der Ansatz bei 37 °C gerührt. Nach 22 h und 44 h werden jeweils weitere 15 mg Pronase P zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 66 h wurden 40 % Z-Glu(OBu^t)-OH gebildet (QTCL). Die Produktisolierung erfolgte wie im Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 6:

24 mg H-Asp(OBu^t)-OBu^t, gelöst in 0,5 ml 0,05 M TRIS/HCL - 0,05 M CaCl₂, pH 7,5, werden mit 5 mg Pankreatin versetzt und der Ansatz bei 37 °C gerührt. Nach 7 h waren 75 % H-Asp(OBu^t)-OH gebildet worden (QTLC).

Beispiel 7:

5 mg Z-Asp(OBzl)-OBzl, gelöst in 0,05 ml N,N-Dimethylacetamid werden mit 2 mg α-Chymotrypsin in 0,15 ml 0,1 M TRIS/HCL, pH 8, versetzt. Nach 16 h Rühren bei 37 °C wurden 53 % Z-Asp(OBzl)-OH gebildet (QTLC). Die Isolierung erfolgte analog Beispiel 1.

Beispiel 8:

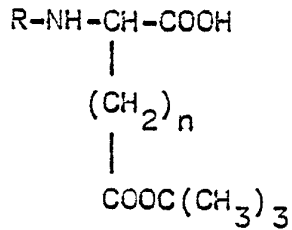
Wie Beispiel 7, nur an Stelle α-Chymotrypsin wird Pronase P verwendet. Nach 16 h wurden 95 % M Z-Asp(OBzl)-OH gebildet (QTLC).

Beispiel 9:

Wie Beispiel 7, nur anstatt α-Chymotrypsin wird Pankreatin eingesetzt. Nach 16 h wurden 74 % Z-Asp(OBzl)-OH nachgewiesen (QTLC).

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung der ω -tert. Butylester von Amino-dicarbonsäuren entsprechend der allgemeinen Formel



wobei R = H, Acyl

n = 1, 2

bedeuten, gekennzeichnet dadurch, daß die entsprechenden α - ω -Di-tert. Butylester unter Verwendung von Enzymen in die gewünschten ω -tert. Butylmonoester überführt werden.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Enzyme Proteasen verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Enzym α -Chymotrypsin verwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Enzym Pronase P verwendet wird.