



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4401/84

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> C 07 C 231/02

(22) Indleveringsdag: 14 sep 1984

C 07 K 1/08

(41) Alm. tilgængelig: 17 mar 1985

(44) Fremlagt: 21 jan 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 16 sep 1983 DE 3333456

(71) Ansøger: \*HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Brueningstrasse 45; 6230 Frankfurt/Main 80, DE

(72) Opfinder: Hans \*Wissmann; DE, Volker \*Teetz; DE

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af carboxylsyreamidgruppeholdige forbindelser, især af peptider

(56) Fremdragne publikationer

EP off. g. skrift nr. 56618

Andre publikationer. Angewandte Chemie, 92, s. 129-130, 1980

(57) Sammendrag:

4401-84

Carboxylsyreamidgruppeholdige forbindelser kan fremstilles ved omsætning af forbindelser, som indeholder en carboxylgruppe, i nærværelse af dialkylphosphinsyreanhydrider med forbindelser, som indeholder en fri amino-gruppe, idet reaktionsblandingsens hydrogenionkoncentration holdes inden for et defineret område ved tildosering af en base under reaktionen, og fraspaltning af eventuelt indførte grupper til beskyttelse af andre funktionelle grupper efter endt reaktion.

Opfindelsen angår en særegen fremgangsmåde til fremstilling af carboxylsyreamidgruppelholdige forbindelser ved omsætning af forbindelser, som indeholder en carboxylgruppe, i nærværelse af dialkylphosphinsyreanhydrider med forbindelser, som indeholder en fri aminogruppe, og den her omhandlede fremgangsmåde er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

Der kendes et stort antal fremgangsmåder til fremstilling af carboxylsyre- og peptidforbindelser (jfr. f.eks. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, bd. XV, del II, s. 1-364). Endvidere er der i Angew. Chemie 92, 129 (1980), beskrevet en fremgangsmåde til fremstilling af carboxylsyreamider, hvor en forbindelse med en fri aminogruppe reagerer med en forbindelse med en fri carboxylgruppe i nærvær af alkylphosphorsyreanhydrid. Alle disse fremgangsmåder sigter med forskelligt resultat på at sikre de for syntesen af peptider nødvendige kriterier med hensyn til racemiseringsfrihed, en enkel og skånsom gennemførlighed med høje udbytter og med let tilgængelige udgangsmaterialer.

Fra EP-A1-56618 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af carboxylsyreamider, ved hvilken carboxylgruppelholdige forbindelser omsættes med forbindelser, der indeholder en fri aminogruppe, i nærværelse af dialkylphosphinsyreanhydrider. Den ved reaktionen frigjorte dialkylphosphinsyre bindes ved et indledningsvis til reaktionsblandingen tilsat overskud af en organisk base eller en basisk puffer.

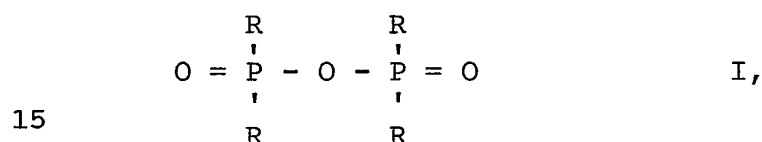
Den foreliggende fremgangsmåde repræsenterer en ny vej til at optimere de nævnte betingelser for en økonomisk syntese af peptider og amider.

Det har vist sig, at carboxylsyreamidgruppelholdige forbindelser, især oligopeptider, kan fremstilles i højere udbytter under milde betingelser, idet forbindelser, som indeholder en fri aminogruppe, især aminocarboxylsyrederivater eller peptider, hvis carboxylgruppe er beskyttet, i nærværelse af et anhydrid af en dialkylphosphinsyre omsættes med forbindelser, som indeholder en fri carboxylgruppe,

især aminocarboxylsyrer eller peptider, hvis aminogruppe er acyleret. Dette opnås ved den her omhandlede fremgangsmåde ved, at man ved tildosering af en base under reaktionen holder hydrogenionkoncentrationen i reaktionsblandingen inden  
 5 for området fra  $10^{-5}$  til  $10^{-10}$  [mol/liter], dvs. holder pH-værdien på 5-10.

De til beskyttelse af de funktionelle grupper indførte rester kan ved syntesen af peptider derefter fraspaltes på gængs måde.

10 Ved anhydrider af dialkylphosphinsyrerne forstås forbindelser med formlen I



hvor i R betyder alkyl. De i formlen viste substituenten R kan være ens eller forskellige. Der foretrækkes anhydrider, hvor begge P-atomerne er ens substitueret.

20 Særligt egnet inden for opfindelsens rammer er anhydrider med formlen (I), hvor R hver gang betyder lavere alkyl, fortrinsvis med 1-4 carbonatomer.

De ifølge opfindelsen anvendelige dialkylphosphinsyreanhydrider er farveløse væsker. De er stabile ved stue-  
 25 temperatur og kan destilleres uden sønderdeling ved formindsket tryk. I de fleste ikke-vandige opløsningsmidler, især i lipidopløsningsmidler, såsom chloroform eller methylenchlorid, men også i polære opløsningsmidler, såsom DMF og DMA, er de let opløselige.

30 Som anhydrider af dialkylphosphinsyrerne skal eksempelvis nævnes methylethylphosphinsyreanhydrid, methylpropylphosphinsyreanhydrid, methyl-butylphosphinsyreanhydrid, diethylphosphinsyreanhydrid, di-n-propylphosphinsyreanhydrid og di-n-butylphosphinsyreanhydrid.

35 Fremstillingen af dialkylphosphinsyreanhydriderne kan ske på kendt måde, f.eks. ved omsætning af dialkylphos-

0

phinsyrechloriderne med dialkylphosphinsyrealkylestre ved 150 - 160°C (jfr. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, G. Thieme Verl., Stuttgart 1963, bd. XII, s. 266 ff). Der foretrækkes især fremgangsmåder, hvor dialkyl-

5 phosphinsyre, salte eller estere deraf omsættes med phosgen (jfr. tysk patentskrift nr. 2.129.583 og tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.225.545).

Den her omhandlede fremgangsmåde gennemføres fortrinsvis i blandet vandige, 1- eller 2-fasede systemer

10 inden for et snævert pH-område, fortrinsvis ved tilnærmelsesvis konstant pH-værdi. Reaktionsblandingerne pH-værdi kan ligge ved 5-10, hensigtsmæssigt skal værdien ligge i det neutrale til det svagt sure. Der foretrækkes især værdier på mellem 5,0 og 7,0. Det er dog også muligt at gennemføre synteser i svagt alkalisk område. Re-

15 guleringen af pH-værdien sker fortrinsvis ved doseret tilsætning af koncentrerede vandige opløsninger af alkalimetallhydroxider, men der kan dog også anvendes organiske baser, såsom N-ethylmorpholin, triethylamin eller trialkylaminer med op til 6 carbonatomer.

20

Til fremstilling af oligopeptider ifølge den her omhandlede fremgangsmåde anvendes der som udgangsmaterialer på den ene side en aminosyre eller et peptid med en blokeret carboxylgruppe og på den anden side en aminosyre eller et peptid med en blokeret aminogruppe.

25

Til beskyttelse af carboxylgrupperne kan der anvendes alle inden for peptidsyntesen gængse beskyttelsesgrupper. Særligt egnet er estere af ligekædede eller forgrenede aliphatiske alkoholer, såsom methanol, ethanol, tert.butanol. Desuden kan der anvendes estere af araliphatiske alkoholer, såsom benzylalkohol eller diphenylmethylecarbinol.

30

Til beskyttelse af aminogruupperne kan der ligeledes anvendes alle de inden for peptidsyntesen gængse beskyttelsesgrupper. Som særligt egnede skal eksempelvis nævnes en carbobenzoxymgruppe og en carbo-tert.butylomgruppe.

35

0

På tale som opløsningsmidler kommer alle de inden for peptidsyntesen gængse vandfrie, indifferente opløsningsmidler, såsom methylenchlorid, chloroform, dimethylformamid, dimethylacetamid, dioxan eller tetrahydrofuran.

5

Som opløsningsmidler kan der ved den enfasede, blandede vandige gennemførelse af reaktionen anvendes blandinger af vand og et med vand blandbart organisk opløsningsmiddel, såsom dioxan, tetrahydrofuran, dimethylformamid eller dimethylacetamid. Anvendelsen af sådanne systemer er især en fordel ved sammenknytning af overvejende vandopløselige peptider.

10

Til en tofaset, blandede vandig gennemførelse af reaktionen kan der anvendes systemer, såsom eddikesyreethyl-ester, eddikesyreisopropylester, eddikesyre-n-butylester, methylenchlorid, glycoldimethylether, 3-methyl-tetrahydrofuran og chloroform, altid i heterogen blanding med vand.

15

Reaktionen forløber som regel tilstrækkeligt hurtigt ved stuetemperatur. En let opvarmning skader ikke. Højere temperaturer, lidt over 30°C, er, især ved peptidsyntesen, ikke anbefalelsesværdig på grund af risikoen for racemisering. Der foretrækkes en reaktionstemperatur på mellem 0 og 30°C, især en temperatur på mellem 5 og 25°C.

20

Den her omhandlede fremgangsmåde tillader for første gang at følge forløbet af omsætningen ved hjælp af forbruget af den anvendte base ved tilnærmelsesvis konstant pH-værdi. I denne forbindelse gennemføres reaktionen fortrinsvis i en selvskrivende pH-stat hensigtsmæssigt under kraftig blanding af det blandede vandige system, der indeholder reaktanterne carboxylkomponenten, aminkomponenten og dialkylphosphinsyreanhydridet. Den af skriveren givne fremstilling af baseforbruget i afhængighed af tiden viser en kurve, som mod slutningen af reaktionen forløber asymptotisk (jfr. kurvegengivelsen i figuren).

25

30

Den her omhandlede fremgangsmåde giver således mulighed for at se slutpunktet for syntesereaktionen på en enkel måde.

35

0

Det skal bemærkes, at de ifølge den beskrevne metode i disse blandet vandige systemer målte "tilsyneladende" pH-værdier kan afvige fra de ægte pH-værdier for disse systemer.

5

Såfremt der på kendt måde anvendes pufferopløsninger til at opfange dialkylphosphinsyren, optræder der tvunget saltoverskud i udgangsblandingerne moderlud, hvilke saltoverskud er sammensat af uorganiske salte. Ved den tekniske gennemførelse af fremgangsmåden besværliggør disse genvindingen af den af kondensationsmidlet fremkomne dialkylphosphinsyre, og kan give anledning til spildevandsproblemer.

10

De ved anvendelsen af alkalimetahydroxider som baser ved denne variant af den her omhandlede fremgangsmåde under reaktionsforløbet dannede alkalimetalsalte er i modsætning til de ved anvendelsen af mange organiske tertiære baser fremkommende salte ved en isolering af reaktionsproduktet ved ekstraktion fra alkalisk opløsning lettere at skille fra en med vand kun begrænset blandbar lipoidfase på grund af den større hydrophilitet. Desuden undgås ved denne fremgangsmåde en forurening af lipoidfasen med ekstraheret tertiær base.

15

20

Den her omhandlede fremgangsmåde er enkel at gennemføre og giver peptider med høj optisk renhed og udbytte. Desuden er den økonomisk og miljøvenlig.

25

Dialkylphosphinsyreanhydriderne er lavmolekylære, lette at fremstille og rense og udviser en høj andel af reaktive grupper pr. vægtenhed samt en god lipophilitet. Dialkylphosphinsyreanhydriderne og de tilhørende dialkylphosphinsyrer er lipidopløselige. Dette muliggør en oparbejdning af vandopløselige peptidderivater via et første fældningstrin med egnede lipidopløsningsmidler.

30

Den ud fra dialkylphosphinsyreanhydridet under peptidsyntesen fremkomne dialkylphosphinsyre kan genvindes fra restopløsningerne fra syntesereaktionen. En genvinding af dialkylphosphinsyrerne fra en større mængde van-

35

0 dige syntesemoderludsvæsker er mulig ved ekstraktion med  
opløsningsmidler, såsom chloroform og isobutanol og efter-  
følgende destillativ oparbejdning. I denne forbindelse er  
5 det af særlig teknisk interesse, at dialkylphosphinsyrerne  
er destillerbare uden sønderdeling under formindsket tryk.  
De således udvundne, genoparbejdede dialkylphosphinsyrer  
kan derefter let omdannes til de tilsvarende dialkylphos-  
phinsyreanhydrider ifølge fremgangsmåden beskrevet i tysk  
10 offentliggørelsesskrift nr. 2.225.545.

10 Ved den beskrevne blandet vandige arbejdsmåde kan  
den organiske base erstattes med alkalimetahydroxidopløs-  
ninger, hvilket i væsentlig grad forenkler den ovenfor be-  
skrevne genoparbejdning af dialkylphosphinsyrerne efter  
syntesen. I dette tilfælde kan man udelade ekstraktions-  
15 trinet. Dialkylphosphinsyren kan derpå efter frigørelsen  
bortdestilleres direkte fra den inddampede syntesemoder-  
lud. Ved den tofasede arbejdsmåde genvindes den efter fra-  
skillensen af lipoidfasen ved syrning og ekstraktion fra  
den vandige fase. De uorganiske neutralsalte bliver derpå  
20 tilbage i den vandige fase.

#### Eksempel 1

##### Carbobenzoxo-glycinethylester

25 Til en opløsning af 10,5 g (0,05 mol) carbobenzoxo-  
glycin i 120 ml eddikesyreethylester sættes under omrøring  
ved  $-5^{\circ}\text{C}$  7,0 g (0,05 mol)  $\text{H-gly-OCH}_3\cdot\text{HCl}$ . Den fremkommende  
suspension tildryppes 20 g methylethylphosphinsyreanhydrid.  
Ved en temperatur på  $0^{\circ}$  til  $+10^{\circ}\text{C}$  indstilles reaktions-  
30 blandingsens pH-værdi til 7,0 med en autotitrator ved til-  
drypning af 4N NaOH, og den ved omrøring med højt omdrej-  
ningstal godt blandede udgangsblanding holdes ved denne  
pH-værdi, indtil den med autotitratoren forbundne skriver  
viser et asymptotisk forløb af natriumhydroxidopløsning-  
35 -forbrugskurven i relation til tidsaksen. Dette er til-  
fældet efter ca. 60 minutter. Derpå fraskilles ethyl-  
acetatfasen, og denne ekstraheres med 2 x 50 ml mættet

0

natriumbicarbonatopløsning, hvorpå den tørres med natriumsulfat, og efter inddampning af opløsningsmidlet under formindsket tryk ved stuetemperatur fås der 12,25 g (84% af det teoretiske) Z-dipeptidester med et smeltepunkt på 81°C.

5

### Eksempel 2

#### Carbobenzoxym-phenylalanin-cyclohexylamid

10

15

20

25

3,0 g (0,01 mol) Z-Phe-OH og 1,0 g (0,01 mol, 1,2 ml) cyclohexylamin opløses i en blanding af 20 ml tetrahydrofuran og 5 ml vand. Efter afkøling af reaktionsblandingen til -5°C, tilsættes der under omrøring 4 g methylethylphosphorsyreanhydrid, og reaktionsopløsningens pH-værdi indstilles til 6,0 med 4 N NaOH, og den holdes konstant under hele omsætningstiden ved doseret tilsætning af natriumhydroxidopløsning som beskrevet i eksempel 1. Efter 60 minutter er reaktionen praktisk taget bragt til ende, som det ses af alkalimetahydroxidforbruget. Reaktionsopløsningen koncentrerer under formindsket tryk ved stuetemperatur, optages med ethylacetat, og ethylacetatopløsningen vaskes med 5% 's kaliumbisulfatopløsning, mættet natriumbicarbonatopløsning og vand, hvorpå den tørres over natriumsulfat, hvorved der efter inddampning af opløsningsmidlet under formindsket tryk ved stuetemperatur og tørring af produktet under formindsket tryk over  $P_2O_5$  fås 3,0 g slutprodukt med et smeltepunkt på 167°C,  $[\alpha]_D^{20} = 3,0^\circ$  (c = 1, DMF).

30

### Eksempel 3

#### Z-Trp-Gly-OCH<sub>3</sub>

35

3,35 g (0,01 mol) Z-Trp-OH opløses i 20 ml eddikesyreisopropylester, og der tilsættes 1,25 g (0,01 mol) H-Gly-OCH<sub>3</sub>, hvorpå den godt omrørte suspension afkøles til -5°C, og der ved denne temperatur under samtidig indstilling af pH-værdien til 5,7 ved doseret tilsætning af 4N NaOH med en autotitrator som beskrevet i eksempel 1

0

tilsættes 4,0 ml methylethylphosphinsyreanhydrid. Reaktionen føres til ende i løbet af 60 minutter under god blanding af faserne. Den fraskilte ethylacetatfase oparbejdes som beskrevet i eksempel 2. Udbytte: 3,53 g (86% af det teoretiske).  $[\alpha]_D^{20} = -13,5^\circ$  (c = 0,1, iseddike).

5

#### Eksempel 4

##### Z-Phe-Arg-Trp-Gly-OCH<sub>3</sub>

10

Til en opløsning af 2,26 g (0,005 mol) Z-Phe-Arg-OH i 25 ml eddikesyreisopropylester sættes 1,55 g (0,005 mol) H-Trp-Gly-OCH<sub>3</sub>·HCl, og den godt omrørte suspension afkøles til -5°C. Derpå tildryppes der 2 ml methylethylphosphinsyreanhydrid, idet pH-værdien holdes konstant ved 5,2 med 4N NaOH som beskrevet i eksempel 1. Efter 15 minutter får reaktionsblandings-  
temperatur lov at stige til stuetemperatur. Efter 70 minutter er omsætningen praktisk taget bragt til ende, som optegnelsen af NaOH-forbruget i relation til reaktionstiden viser. Derpå skilles ethylacetatfasen fra, og den vaskes med vand og mættet natriumbicarbonatopløsning, hvorefter reaktionsproduktet isoleres fra den tørrede opløsning ved inddampning under formindsket tryk ved stuetemperatur og digereret af remanensen med absolut diethylether. Udbytte efter omkrystallisation fra ethanol/-ether: 3,0 g (84,5% af det teoretiske).  $[\alpha]_D^{20} = -25,7^\circ$  (c = 0,1, DMF).

15

20

25

30

#### Eksempel 5

##### Z-Lys(Boc)-Val-Tyr-OCH<sub>3</sub>

35

1,91 g (0,005 mol) Z-Lys(Boc)-OH opløses i 25 ml med vand mættet butylacetat, hvorpå der tilsættes 1,65 g (0,005 mol) H-Val-Tyr-OCH<sub>3</sub>·HCl, og den godt omrørte reaktionsblanding afkøles til -5°C, hvorefter pH-værdien for

0

den hurtigt omrørte blanding bringes op på 7,0 med 4 N NaOH som beskrevet i eksempel 1. Blandingen holdes på denne pH-værdi under hele reaktionstiden (70 minutter). Temperaturen holdes under de første 10 minutter af reaktionstiden på -5°C til 0°C, hvorpå man lader reaktionsblandingen opvarme til stuetemperatur. Oparbejdningen af butylacetatfasen, som indeholder slutproduktet, foregår som anført i eksempel 2.

Udbytte efter omkrystallisation fra ethanol/ether:  
10 3,0 g (91% af det teoretiske).  $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ}$  (c = 1, ethanol).

#### Eksempel 6

#### Z-Gly-Leu-Arg-OCH<sub>3</sub>

En opløsning af 642 mg Z-Gly-Leu-OH og 449 mg  
15 H-Arg-OMe·HCl i 3 ml dimethylacetamid og 0,5 ml vand tilsættes 1,3 ml methylethylphosphorsyreanhydrid, og under den reaktion, der nu forløber, holdes pH-værdien ved 7,2 med en blanding af N-ethylmorpholin og vand (1:1, Vol/Vol) med en pH-stat. Efter 40 minutter er reaktionen bragt  
20 til ende ifølge skriver-optegnelsen. Oparbejdningen foregår som beskrevet i eksempel 2, dog uden den der anførte ekstraktion af ethylacetatfasen med 5% kaliumbisulfatopløsning. Udbytte: 700 mg (71% af det teoretiske).  
25  $[\alpha]_D^{20} = -24,4^{\circ}$  (c = 1, CH<sub>3</sub>OH).

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af carboxylsyre-  
amidgruppeholdige forbindelser ved omsætning af forbindelser,  
som indeholder en carboxylgruppe, i nærværelse af dialkyl-  
5 phosphinsyreanhydrider med forbindelser, som indeholder en  
fri aminogruppe, k e n d e t e g n e t ved, at man ved  
tildosering af en base under reaktionen holder reaktionsblan-  
dingens hydrogenionkoncentration inden for området fra  $10^{-5}$   
til  $10^{-10}$  [mol/liter], dvs. holder pH-værdien på 5-10, samt  
10 at man efter endt reaktion fraspalter grupper, der eventuelt  
er indført til beskyttelse af andre funktionelle grupper.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der fremstilles peptider.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at reaktionen gennemføres i et homogent  
15 eller heterogent blandet, vandigt medium.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at der som baser anvendes vandige  
opløsninger af alkalimetahydroxider.

20 5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at der som baser anvendes tri-  
alkylaminer.

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at syntesereaktionens slutpunkt  
25 bestemmes ved hjælp af skriveroptegnelse med en pH-stat  
(baseforbrug i relation til reaktionstid).

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at reaktionen gennemføres ved  
en temperatur på mellem 0 og 30°C.

30 8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien under omsætningen  
holdes på 5-7.

