



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110563869 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201910835843.6

C08F 112/14 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.05

C07K 1/06 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 1/00 (2006.01)

申请公布号 CN 110563869 A

C07K 1/34 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.12.13

(56) 对比文件

(73) 专利权人 苏州昊帆生物股份有限公司

CN 107311961 A, 2017.11.03

地址 215129 江苏省苏州市高新区鸿禧路
32号12栋

CN 109563175 A, 2019.04.02

FR 2434802 A1, 1980.04.30

(72) 发明人 吕敏杰 王桂春 张海燕

Andrew J. Neel, et al.. Mild Synthesis of Substituted 1,2,5-Oxadiazoles Using 1, 1'-Carbonyldiimidazole as a Dehydrating Agent.《Organic Letters》.2018,第20卷(第7期),第2024-2027页.

(74) 专利代理机构 苏州国卓知识产权代理有限公司 32331

审查员 赵然然

代理人 明志会

(51) Int. Cl.

C08F 126/02 (2006.01)

C08F 8/32 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种树脂型多肽缩合试剂及其制备方法与
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种树脂型多肽缩合试剂及其制备方法与应用,属于化学合成技术领域。用丙烯胺或4-乙基苯胺与氰乙酸乙酯进行胺酯交换反应得到化合物A,化合物A与亚硝酸反应生成化合物B,B经聚合形成聚合物树脂C,树脂中的羟肟基与卤代物反应,得到具有脱水活性的聚合物树脂多肽缩合试剂。本发明以氰乙酸乙酯为原料,经肟化,聚合、酯化得到具有聚合物特性的树脂型多肽缩合试剂。树脂型多肽缩合试剂既可以发挥与常规多肽缩合试剂相同的缩合活性,又具有聚合物溶解度差的特性,可以通过过滤直接从溶液中分离出来,除水后可以回收再重新加工成树脂型多肽缩合试剂,实现对大分子离去基团的重复利用,提高原子经济性,实现多肽、蛋白质的绿色合成。

(4) 将氨基酸、三乙胺、所述树脂型多肽缩合试剂混合后室温反应,得到多肽或者蛋白质。

10. 利用如权利要求1所述的树脂型多肽缩合试剂合成多肽或者蛋白质后回收缩合副产物的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 利用胺化合物与氰乙酸乙酯进行交换反应得到化合物A;所述胺化合物为丙烯胺或4-乙烯基苯胺;

(2) 利用化合物A与亚硝酸盐、酸进行脲化反应生成化合物B;然后在引发剂作用下,化合物B聚合反应得到化合物C;

(3) 在碱存在下,利用化合物C与卤代物进行酯化反应,得到所述树脂型多肽缩合试剂;

(4) 将氨基酸、三乙胺、所述树脂型多肽缩合试剂混合后室温反应,得到多肽或者蛋白质;

(5) 步骤(4)反应结束后,过滤反应液,得到的滤饼用水洗涤后用甲醇打浆洗涤,之后过滤,收集滤饼烘干得缩合副产物。

一种树脂型多肽缩合试剂及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽合成技术领域,具体涉及一种树脂型多肽缩合试剂及其制备方法与应用。

背景技术

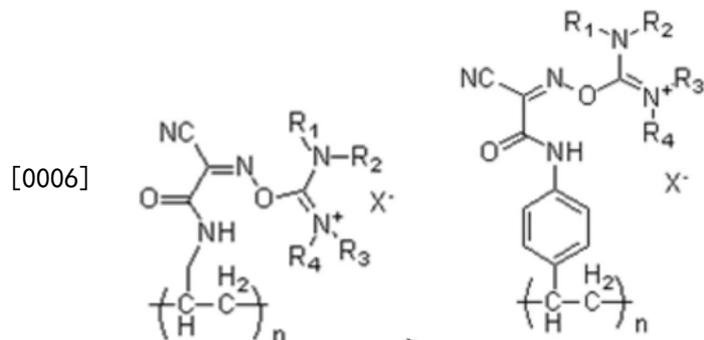
[0002] 多肽缩合试剂是合成多肽、蛋白质过程中构成酰胺键的专属试剂,应用其在反应液中的脱水缩合活性,可以将氨基酸按照指定序列连接起来,是酰胺键或多肽合成领域常用方法。目前常用的多肽缩合试剂主要包括碳二亚胺类、脲正离子型、磷正离子型三种。碳二亚胺类缩合试剂活性较低,其脱水缩合后的副产物脲在一般溶剂中都有一定溶解度,容易残留溶液中对多肽的纯度造成影响。脲正离子型和磷正离子型缩合试剂缩合活性高,但其发挥催化活性后生成的副产物均作为离去基团溶解于水中,无法被回收继续利用,导致反应原子经济性低,不符合绿色化学合成的要求。关于树脂型多肽缩合试剂的合成方法,目前尚无相关报道。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供一种树脂型多肽缩合试剂及其制备方法,以易得的氰乙酸乙酯和丙烯胺或4-胺基苯乙烯为原料,经过四步反应合成具有聚合物特性的树脂型多肽缩合试剂。该种缩合试剂既具有显著的缩合活性,又具有聚合物树脂的性质,方便缩合后的试剂副产物与溶液的分,发挥缩合活性后的副产物可以重新回收,材料可以循环套用,符合绿色合成要求,具有广阔的应用前景。

[0004] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0005] 一种树脂型多肽缩合试剂,所述树脂型多肽缩合试剂的化学结构式如下:



[0007] 3. 其中,所述 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立的选自甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或者己基;所述的 X^- 选自氯离子、四氟硼酸离子或者六氟磷酸离子; n 为聚合物中包含的单体的个数,选自100-2000。

[0008] 本发明公开了上述树脂型多肽缩合试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 利用胺化合物与氰乙酸乙酯进行交换反应得到化合物A;所述胺化合物为丙烯胺或4-乙烯基苯胺;

[0010] (2) 利用化合物A与亚硝酸盐、酸进行脞化反应生成化合物B;然后在引发剂作用

下,化合物B聚合反应得到化合物C;

[0011] (3) 在碱存在下,利用化合物C与卤代物进行酯化反应,得到所述树脂型多肽缩合试剂。

[0012] 一种多肽或者蛋白质的合成方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 利用胺化合物与氰乙酸乙酯进行交换反应得到化合物A;所述胺化合物为丙烯胺或4-乙烯基苯胺;

[0014] (2) 利用化合物A与亚硝酸盐、酸进行脞化反应生成化合物B;然后在引发剂作用下,化合物B聚合反应得到化合物C;

[0015] (3) 在碱存在下,利用化合物C与卤代物进行酯化反应,得到所述树脂型多肽缩合试剂;

[0016] (4) 将氨基酸、三乙胺、所述树脂型多肽缩合试剂混合后室温反应,得到多肽或者蛋白质。

[0017] 一种合成多肽或者蛋白质后回收缩合副产物的方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 利用胺化合物与氰乙酸乙酯进行交换反应得到化合物A;所述胺化合物为丙烯胺或4-乙烯基苯胺;

[0019] (2) 利用化合物A与亚硝酸盐、酸进行脞化反应生成化合物B;然后在引发剂作用下,化合物B聚合反应得到化合物C;

[0020] (3) 在碱存在下,利用化合物C与卤代物进行酯化反应,得到所述树脂型多肽缩合试剂;

[0021] (4) 将氨基酸、三乙胺、所述树脂型多肽缩合试剂混合后室温反应,得到多肽或者蛋白质;

[0022] (5) 步骤(4)反应结束后,过滤反应液,得到的滤饼用水洗涤后用甲醇打浆洗涤,之后过滤,收集滤饼烘干得缩合副产物。

[0023] 本发明的缩合试剂具有显著的缩合活性,又具有聚合物树脂的性质,方便缩合后的试剂与溶液的分离,发挥缩合活性后的副产物可以重新回收,回收的副产物为化合物C,再次经过酯化反应可以得到新的树脂型多肽缩合试剂。

[0024] 上述技术方案中,步骤(1)中,胺化合物与氰乙酸乙酯的摩尔量之比为(1.2~2):1;交换反应的反应时间为1~8h,反应温度为10~40℃;交换反应在极性溶剂中进行,极性溶剂比如乙醇、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、乙腈等。

[0025] 上述技术方案中,步骤(2)中,亚硝酸盐包括亚硝酸钠、亚硝酸钾,酸为无机酸,比如硫酸、盐酸、磷酸、硝酸等;化合物A与亚硝酸盐的摩尔比为1:(1~1.5);酸与亚硝酸盐的摩尔比为(1.5~2):1。优选的,将酸滴加入亚硝酸钠与化合物A的混合物中,滴加完毕后利用TLC检测反应结束,得到化合物B;进一步优选的,滴加酸时,亚硝酸钠与化合物A的混合物的温度低于25℃,滴加完毕后于40℃反应1h,然后升温至45度,利用TLC检测反应结束,得到化合物B。

[0026] 上述技术方案中,步骤(2)中,化合物B在引发剂的作用下发生烯烃的聚合反应得到化合物C;引发剂包括过氧化物引发剂、过硫酸盐引发剂、偶氮化合物引发剂、紫外光引发剂、等离子体引发剂;引发剂用量为化合物B质量的0.1~0.5%。优选聚合反应在非质子性溶剂中进行,非质子性溶剂包括乙腈、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯等,非质子性溶剂与化合物

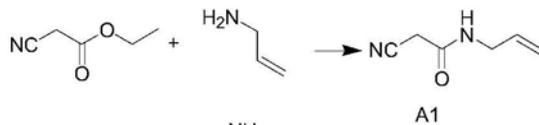
B的质量比为(5~20):1。当引发剂为自由基引发剂(氧化物引发剂、过硫酸盐引发剂、偶氮化合物引发剂)时,聚合反应为在回流温度下搅拌1h~3h。

[0027] 上述技术方案中,步骤(3)中,碱包括三乙胺、二异丙基乙胺、三正丙胺、三正丁胺;化合物C、碱、卤代物的摩尔比为(1~3):(1~1.2):1;酯化反应在非质子性溶剂中进行,非质子性溶剂包括二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃、二氧六环等;酯化反应的温度为室温,时间为2~6小时。

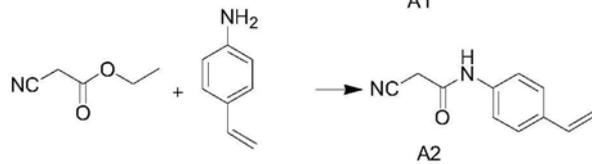
[0028] 本发明公开了上述树脂型多肽缩合试剂在合成多肽或者蛋白质中的应用。

[0029] 本发明制备方法可具体举例如下:

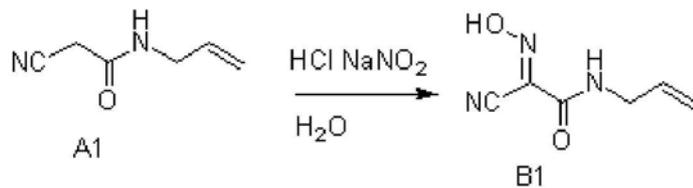
[0030] 步骤(1)将丙烯胺或4-乙烯基苯胺与氰乙酸乙酯进行胺酯交换反应得到化合物A1和A2;反应时间1-8h;反应温度为10-40℃,其具体制备过程如下式所示:



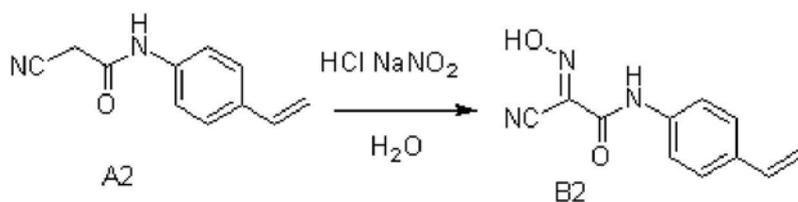
[0031]



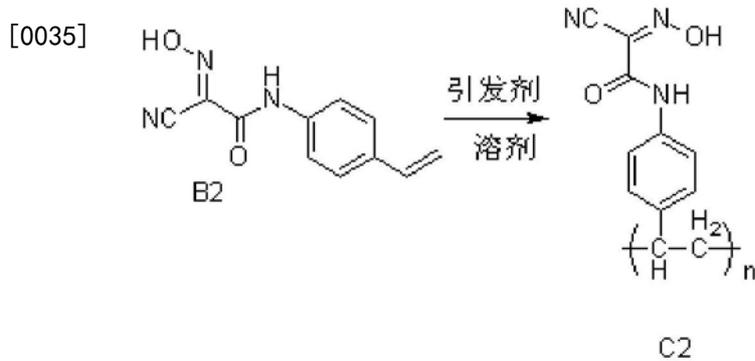
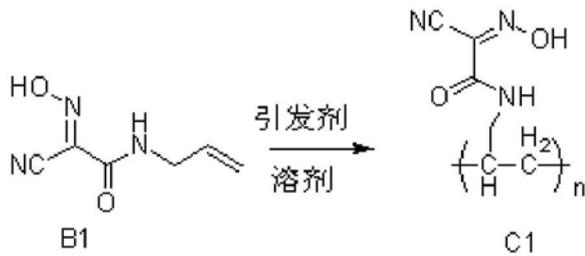
[0032] 步骤(2)将化合物A1或者化合物A2在溶剂中与亚硝酸盐、酸反应,生成含有肟基结构的聚合物单体化合物B1或B2,反应时间1-8h;溶剂为水,其具体制备过程如下式所示:



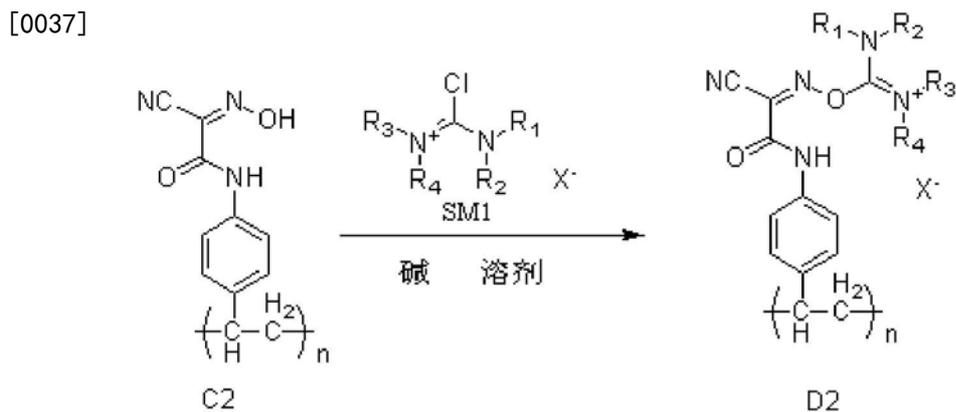
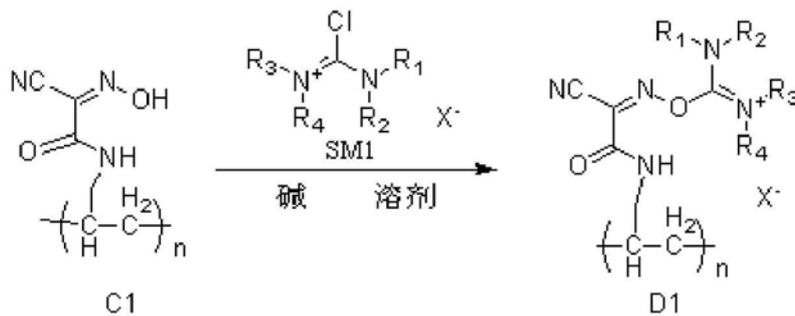
[0033]



[0034] 步骤(2)将化合物B1或B2,在溶剂中经自由基引发剂或其他引发剂的作用下发生烯烃的聚合反应得到化合物C1或C2,其具体制备过程如下式所示:



[0036] 步骤(3) 将化合物C1或C2,在溶剂中、在碱存在下,与卤代物反应,其具体制备过程如下式所示:

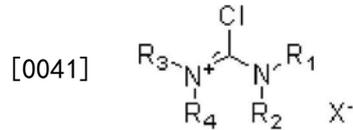


[0038] 本发明中,步骤(1)反应结束,将反应液浓缩干,加入二氯甲烷,搅拌后二氯甲烷相用盐酸洗涤,分出二氯甲烷相并用饱和食盐水洗涤,分液后干燥,浓缩干得到淡黄色粘稠液体为化合物A;步骤(2)脲化反应结束后加入浓盐酸,搅拌冷却至0℃,保温2h,析出白色固体,抽滤,再将收集的固体用冰水洗涤后烘干,得白色固体为化合物B;步骤(2)聚合反应结束后反应液冷却至室温,过滤,滤饼用乙腈洗涤,烘干后得到白色粉末为化合物C;步骤(3)酯化反应结束后过滤反应液,滤饼用甲醇洗涤,收集滤饼并烘干得白色固体粉末为最终产

物树脂型多肽缩合试剂。

[0039] 本发明中,化合物A由上述化合物A1、化合物A2表示,化合物B 由上述化合物B1、化合物B2表示,化合物C由上述化合物C1、化合物 C2表示,树脂型多肽缩合试剂由上述化合物D1、化合物D2表示;

[0040] 卤代物的化学结构式如下:



[0042] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立的选择甲基、乙基、丙基、丁基,或由 R_1 与 R_2 , R_3 与 R_4 连接形成的丁基,戊基、己基等脂肪基团及其同系物;所述 X^- 可以是氯离子、四氟硼酸离子、六氟磷酸离子。

[0043] 本发明的有益效果在于:

[0044] 1.本发明以廉价易得的氰乙酸乙酯和丙烯胺或4-氨基苯乙烯为原料,经过四步反应得到一种树脂型多肽缩合试剂;

[0045] 2.本发明得到一种树脂型多肽缩合试剂,有显著的缩合活性;

[0046] 3.本发明得到一种树脂型多肽缩合试剂,缩合试剂方便从溶液中分离,提高提纯效率,实现原材料的回收再利用。

具体实施方式

[0047] 结合以下具体实施例,对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。

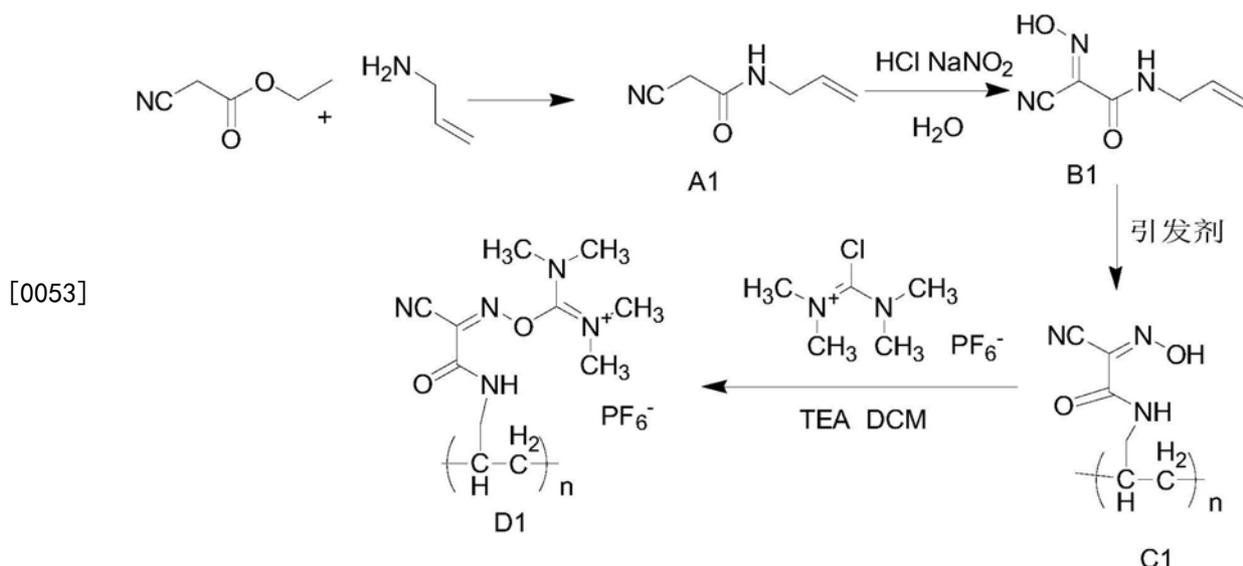
[0048] 本发明公开的树脂型多肽缩合试剂的制备方法如下:

[0049] (1) 利用胺化合物与氰乙酸乙酯进行交换反应得到化合物A;所述胺化合物为丙烯胺或4-乙烯基苯胺;

[0050] (2) 利用化合物A与亚硝酸盐、酸进行脎化反应生成化合物B;然后在引发剂作用下,化合物B聚合反应得到化合物C;

[0051] (3) 在碱存在下,利用化合物C与卤代物进行酯化反应,得到所述树脂型多肽缩合试剂。

[0052] 实施例1



[0054] 1. 化合物A1的制备

[0055] 将氰基乙酸乙酯113.2g加入到600ml四氢呋喃中,然后加入74.1g丙烯胺,保持20℃搅拌8h,然后将反应液浓缩干,加入二氯甲烷400ml,搅拌后二氯甲烷相用1N盐酸300ml洗涤,分出二氯甲烷相并用饱和食盐水 100ml洗涤,分液后干燥,浓缩干得到淡黄色粘稠液体114.2g,收率 91.9%,为化合物A1。

[0056] ¹H-NMR (500MHz, DMSO) : 3.62 (s, 2H) , 3.87-3.90 (t, 2H) , 5.10-5.14 (t, 2H) , 5.80-5.86 (d, 1H) , 8.11 (s, 1H) 。

[0057] 2. 化合物B1的制备

[0058] 反应瓶中加入亚硝酸钠76.2g以及水600mL,加入114.2g化合物 A1,滴加磷酸(98wt%) 117.6g,控制温度低于25℃,1.5h滴加完毕,然后于40℃反应1h,然后升温至45度,TLC检测至反应结束,加入浓盐酸(37wt%) 72.3ml,搅拌冷却至0度,保温2h,析出白色固体,抽滤,收集固体,固体冰水洗涤后烘干,得白色固体112.3g,熔点128-130℃,收率78.8%,为化合物B1。

[0059] ¹H-NMR (500MHz, DMSO) : 3.12 (s, 1H) , 3.89-3.92 (t, 2H) , 5.11-5.15 (t, 2H) , 5.80-5.86 (d, 1H) , 8.02 (s, 1H) 。

[0060] 3. 化合物C1的制备

[0061] 反应瓶中加入乙腈100ml,加入偶氮二异丁腈1g,然后在回流温度下、搅拌下,滴加化合物112.3g B1溶于乙腈300ml的溶液,滴加过程中控制反应温度回流,滴完后回流保温1h,反应液冷却至室温,过滤,滤饼用乙腈50ml洗涤,烘干后得到白色粉末99.6g,收率88.7%,为化合物 C1。

[0062] ¹H-NMR (500MHz, DMSO) : 1.18-1.20 (t, 2H) , 1.39-1.40 (d, 1H) , 3.65-3.68 (d, 2H) , 6.20- 6.22 (d, 1H) , 8.3 (s, 1H) 。

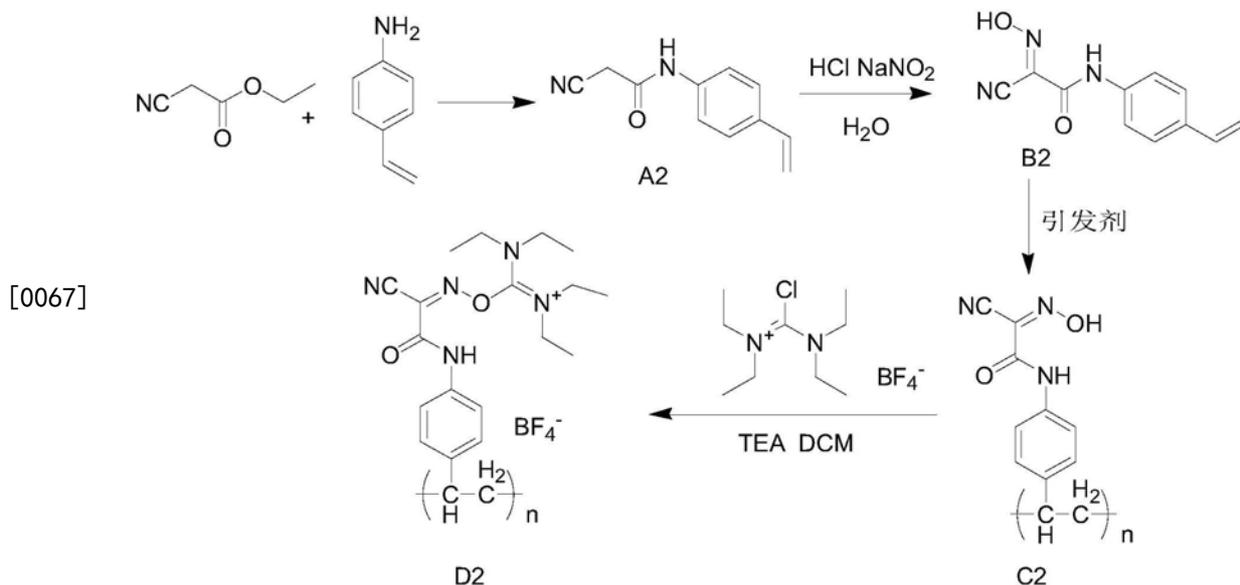
[0063] 4. 化合物D1的制备

[0064] 室温下,反应瓶中加入DMF400ml,然后加入化合物C1 99.6g以及 N,N,N',N'-四甲基氯甲脒六氟磷酸盐182.2g,搅拌下滴加三乙胺66g,滴完继续搅拌4h,过滤,滤饼用甲醇200ml洗涤,收集滤饼并烘干得白色固体粉末212.6g,取样用氯化四苯砷的标准溶液电位滴定检测,含量 97.2%,收率88.9%。经凝胶渗透色谱(GPC)测定聚合物分子量分布,经计算n

=180-390。

[0065] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO) : 1.25-1.28 (t, 2H) , 1.40-1.41 (d, 1H) , 3.05-3.11 (s, 12H) , 3.68- 3.69 (d, 2H) , 8.31 (s, 1H) 。

[0066] 实施例2



[0068] 1. 化合物A2的制备

[0069] 将氰基乙酸乙酯113.2g加入到600ml四氢呋喃中,然后加入4-氨基苯乙烯142.8g,保持25℃搅拌8h,将反应液浓缩干,加入二氯甲烷400ml,搅拌后二氯甲烷相用1N盐酸300ml洗涤,分出二氯甲烷相并用饱和食盐水100ml洗涤,分液后干燥,浓缩干得到淡黄色粘稠液体 176.2g,收率94.6%。

[0070] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO) : 3.35 (s, 2H) , 5.18 (s, 1H) , 5.61 (s, 1H) , 7.28-7.30 (d, 2H) , 7.60- 7.62 (d, 2H) , 8.22 (s, 1H) 。

[0071] 3. 化合物B2的制备

[0072] 反应瓶中加入亚硝酸钠65.8g以及水600mL,加入化合物A2 176.2g,滴加盐酸(37wt%) 140.2g,控制温度低于25℃,约滴加1.5h,然后于40℃反应1h,然后升温至45℃,TLC检测反应结束,加入浓盐酸(37wt%) 82.2ml,搅拌冷却至0度,保温2h,析出白色固体,抽滤,收集固体,固体冰水洗涤后烘干,得白色固体203.4g,收率88.8%。

[0073] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO) : 4.11 (s, 1H) , 5.20 (s, 1H) , 5.63 (s, 1H) , 6.63 (s, 1H) , 7.31-7.33 (d, 2H) , 7.62-7.64 (d, 2H) , 8.12 (s, 1H) 。

[0074] 3. 化合物C2的制备

[0075] 反应瓶中加入乙酸乙酯200ml,加入过氧化苯甲酰2g,然后在回流温度下、搅拌下,快速搅拌并滴加203.4g化合物B2溶于乙腈400ml的溶液,滴加过程中控制反应温度至回流,滴完后回流保温2h,反应液冷却至室温,过滤,滤饼用乙酸乙酯80ml洗涤,烘干后得到白色粉末 188.6g,为化合物C2,收率92.6%。

[0076] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO) : 1.24-1.28 (t, 2H) , 1.44-1.46 (d, 1H) , 4.17 (s, 1H) , 7.32-7.34 (d, 2H) , 7.62-7.64 (d, 2H) , 8.64 (s, 1H) 。

[0077] 4. 化合物D2的制备

[0078] 室温下,反应瓶中加入DMF500ml,然后加入化合物C2 188.6g以及N,N,N',N'-四乙基氯甲脒四氟硼酸盐260.4g,搅拌下滴加三乙胺 88.2g,滴完继续搅拌5h,过滤,滤饼用甲醇200ml洗涤两次,收集滤饼并烘干得白色固体粉末330.2g,取样用离子色谱法检测产品纯度98.2%,收率87.6%。经凝胶渗透色谱(GPC)测定聚合物分子量分布,经计算 $n=260-502$ 。

[0079] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO) : 1.24-1.28 (t, 2H) , 1.44-1.46 (d, 1H) , 1.56-1.62 (d, 12H) , 3.02- 3.12 (t, 8H) , 4.17 (s, 1H) , 7.32-7.34 (d, 2H) , 7.62-7.64 (d, 2H) , 8.64 (s, 1H) 。

[0080] 实施例3

[0081] 1、化合物D1的缩合活性测试

[0082] 本发明选取带有紫外吸收的N-BOC-D-苯甘氨酸与甘氨酸甲酯盐酸盐通过缩合试剂进行缩合反应,固定游离碱使用摩尔量与甘氨酸甲酯盐酸盐使用量一致,用HPLC检测原料N-BOC-D-苯甘氨酸的剩余情况。具体操作过程如下:

[0083] 反应瓶中加入N-BOC-D-苯甘氨酸251.2g、DMF 600ml,甘氨酸甲酯盐酸盐125.2g、三乙胺101.3g (1.0eq),然后加入上述化合物D1 476.4g (1.2eq),室温搅拌6h,取样用HPLC检测N-BOC-D-苯甘氨酸剩余情况。结果如下:

[0084]	缩合试剂 (1.2eq)	游离碱 (1.0eq)	反应时间 (h)	N-BOC-D-苯甘氨酸剩余 (%)
	HBTU	TEA	6	8.8
	COMU	TEA	6	10.1
	DEPBT	TEA	6	10.6
	化合物D1	TEA	6	9.5

[0085] 从表1可以看出,化合物D 1的缩合活性相对于脲正离子型缩合试剂 HBTU略低,但与常规缩合试剂COMU、DEPBT缩合活性相比较,原料剩余量少。

[0086] 2、化合物C1回收

[0087] 上步化合物D1参与的缩合反应结束后,反应液过滤,滤饼用400ml 水洗涤两次除去三乙胺盐酸盐,然后200ml甲醇打浆洗涤两次除去水分后过滤,收集滤饼烘干得白色固体粉末C1 170.6g,回收收率92.8%。

[0088] 3、回收聚合物C1制备聚合物D1

[0089] 室温下,反应瓶中加入DMF 400ml,然后加入所述回收的化合物C1 170.6g以及N,N,N',N'-四甲基氯甲脒六氟磷酸盐312.1g,搅拌下滴加三乙胺113.2g,滴完继续搅拌4h,过滤,滤饼用甲醇200ml洗涤,收集滤饼并烘干得白色固体粉末362.5g,氯化四苯砷的标准溶液电位滴定检测(结果与实施例一基本一样,正常),含量97.6%,收率87.7%。

[0090] 综上所述,本发明树脂型多肽缩合试剂既可以发挥与常规多肽缩合试剂相同的缩合活性,又具有聚合物溶解度差的特性,可以通过过滤直接从溶液中分离出来,除水后可以回收再重新加工成树脂型多肽缩合试剂,实现对大分子离去基团的重复利用,提高原子经济性,实现多肽、蛋白质的绿色合成。

[0091] 以上对本发明做了详尽的描述,其目的在于让熟悉该领域的技术人员能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。