

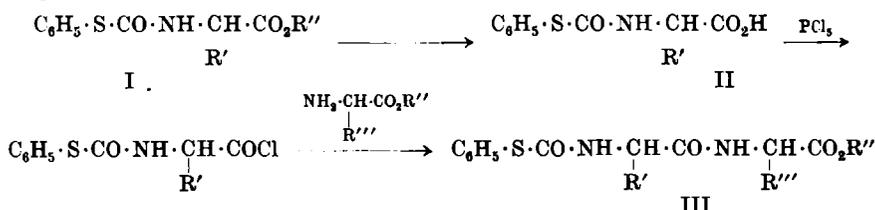
324. János Kollonitsch, Andor Hajós und Valeria Gábor: Neue Methoden zur Peptidsynthese, I. Mitteil.¹⁾: Die *N*-[Phenylmercapto-formyl]-Gruppe als Schutzgruppe bei der Synthese von Peptiden

[Aus dem Forschungsinstitut für die Pharmazeutische Industrie, Budapest]

(Eingegangen am 8. Mai 1956)

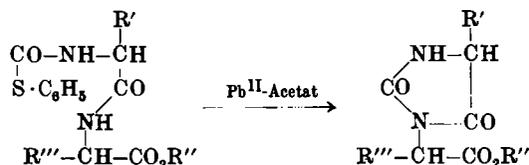
Die nach der Methode von Ehrens v ä r d herstellbaren *N*-[Phenylmercapto-formyl]-aminosäuren und -peptide können oxydativ zu den entsprechenden Aminosäuren bzw. Peptiden abgebaut werden. Auf diese Weise werden Glycyl-glycin, Glycyl-DL-alanin und α -L-Glutamyl-L-tyrosin hergestellt. Einige neue *N*-[Phenylmercapto-formyl]-dipeptidester werden beschrieben.

Nach einer Mitteilung von G. C. H. Ehrens v ä r d²⁾ geben Aminosäureester mit Thiokohlensäure-*S*-phenylester-chlorid (Phenylmercapto-formyl-chlorid = PhMF-Chlorid)³⁾ gut kristallisierende *N*-PhMF-Abkömmlinge I, welche mit Essigsäure/Salzsäure zu den *N*-PhMF-Aminosäuren II verseifbar sind. Deren Säurechloride können mit Aminosäureestern zu *N*-PhMF-Peptidestern III umgesetzt werden.



Nach dem vorstehenden Formelschema haben wir folgende Verbindungen hergestellt: *N*-PhMF-Asparaginsäure-anhydrid, *N*-PhMF-*threo*- β -DL-Phenylserin-äthylester, *N*-PhMF-DL-Phenylalanin-äthylester, *N*-PhMF- α -L-Glutamyl-L-tyrosin-äthylester, *N*-PhMF- α -L-Glutamyl-glycin-äthylester und *N*-PhMF-Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester.

Nach Ehrens v ä r d kann die PhMF-Gruppe aus den Verbindungen der allgemeinen Formel III durch vorsichtiges Erwärmen mit Blei(II)-acetat-Lösung unter Bildung des entsprechenden Peptidesters abgespalten werden. Spätere Arbeiten bestätigten wohl die gute Durchführbarkeit der Reaktionen I–III, sie ergaben jedoch, daß die Spaltung mit Bleiacetat nicht zu Peptidestern, sondern zu den entsprechenden Hydantoinen führt⁴⁾:



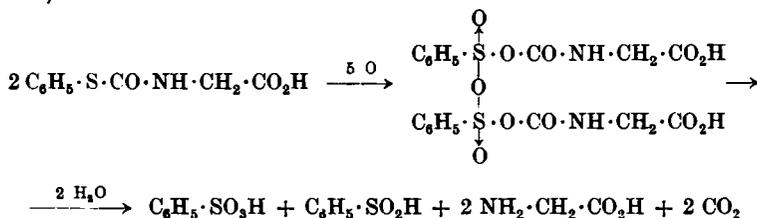
¹⁾ Teilweise vorgetragen auf dem XIV. Internat. Kongreß für Reine und Angewandte Chemie (Zürich, Juli 1955). Siehe weiter die vorläufige Mitteilung in Nature [London], im Druck. ²⁾ Nature [London] 159, 500 [1947].

³⁾ M. H. Rivier, Bull. Soc. chim. France [4] 1, 733 [1907].

⁴⁾ a) A. Lindemann, N. H. Khan u. K. Hofmann, J. Amer. chem. Soc. 74, 476 [1952]; b) J. I. Harris u. T. S. Work, Biochem. J. 46, 587 [1950].

Da die Hydantoine nicht in Peptide übergeführt werden können, ist die Reaktion für peptidsynthetische Zwecke nicht brauchbar.

Da wir es für lohnend hielten, die Ehrensvärdische Methode wegen der vorteilhaften Eigenschaften der Zwischenprodukte weiterzuverfolgen, versuchten wir, das Schwefelatom der PhMF-Verbindungen zu oxydieren, in der Annahme, daß nach der Oxydation ein Zwischenprodukt mit Anhydrid-Struktur entstünde, dessen Hydrolyse die gewünschten Peptid-Abkömmlinge liefern sollte⁵⁾. Tatsächlich konnten wir nach Erwärmen von *N*-PhMF-Glycin mit Eisessig und Wasserstoffperoxyd mit Hilfe von Benzoylchlorid Glycin als Hippursäure in 44-proz. Ausbeute gewinnen. Als schonenderes und schnelleres Oxydationsmittel erwies sich Benzopersäure. *N*-PhMF-Glycin nahm in Essigsäure bei 0° aus Benzopersäure in Benzol nach 1¹/₂ Stdn. 2.5 Atome Sauerstoff auf. Es konnten so 73 % reines Glycin erhalten werden, welches von der begleitenden Benzolsulfonsäure mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule getrennt wurde. Der oxydative Abbau geht wahrscheinlich in folgender Weise vor sich *):



Auch mit Ozon konnte *N*-PhMF-Glycin mit guter Ausbeute abgebaut werden.

Die Methode ließ sich auf Peptidester übertragen. Die mit Hilfe des Anionenaustauschers gewonnenen Peptidester wurden in gewohnter Weise mit wäßriger Natronlauge verseift und danach das Peptid mit einem Kationenaustauscher (Dowex 50) isoliert. Die Reinheit der Verbindungen wurde durch Schmp., Analyse und Papierchromatographie kontrolliert. Auf diese Weise haben wir Glycyl-glycin, Glycyl-DL-alanin, α -L-Glutamyl-L-tyrosin hergestellt. Schwefelhaltige Peptide können durch oxydativen Abbau nicht hergestellt werden⁶⁾, weil sie mit Persäuren reagieren.

Im Zusammenhang mit der Verwendung der *N*-PhMF-Abkömmlinge der optisch aktiven Aminosäuren als Acylierungskomponenten, schien es wichtig, deren Reaktion mit Diazomethan zu untersuchen. Wie H. E. Carter und J. W. Hinman⁷⁾ gezeigt haben, sind gewisse, Acylgruppen (z. B. Benzoyl) enthaltende Verbindungen, die man früher für *N*-Acylaminosäure-hydrochloride hielt, in Wirklichkeit Oxazolone-hydrochloride. Die Herstellung solcher *N*-

⁵⁾ Über die leichte Oxydierbarkeit z. B. von Alkylsulfiden vergl. L. Lewin, J. prakt. Chem. 113, 40 [1926].

*) Vorläufige Angaben, da unsere Untersuchungen über den Oxydationsmechanismus und die Struktur der Zwischenverbindungen den Gegenstand einer anderen Arbeit bilden. ⁶⁾ G. Toennies, J. Amer. chem. Soc. 56, 2198 [1934].

⁷⁾ J. biol. Chemistry 178, 403 [1949].

Acylaminosäure-hydrochloride ist selbstverständlich mit Racemisierung verbunden⁶⁾. Wir haben diese Frage mit der Methode von Carter geprüft. *N*-PhMF-Glycylchlorid wurde mit Diazomethan umgesetzt und das gebildete Diazoketon mit Salzsäure zersetzt; es entstand das Chlorketon $C_6H_5 \cdot S \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_2Cl$. Bei den *N*-PhMF-Aminosäure-hydrochloriden ist daher keine Racemisierung zu erwarten.

Durch Hydrazinhydrat werden die *N*-PhMF-Derivate in Carbonyldiaminosäure-dihydrazide, $OC(NH \cdot CHR \cdot CO \cdot NH \cdot NH_2)_2$, und Dithiokohlensäure-*S,S*-diphenylester zerlegt.

Die PhMF-Gruppe kann wahrscheinlich auch in zahlreichen anderen Fällen als Schutz von Amino- und Hydroxylgruppen mit Vorteil verwendet werden.

Beschreibung der Versuche

N-PhMF-Glycin-äthylester: Die Suspension von 1.4 g Glycin-äthylesterhydrochlorid in 10 ccm Chloroform wird unter Eiskühlung mit 2.8 ccm Triäthylamin und 1.72 g PhMF-Chlorid geschüttelt. Die Lösung wird über Nacht im Eisschrank stengelassen, mit 4 ccm *n* HCl und 4 ccm Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Rückstand 2.19 g. Aus 5 ccm Alkohol umkristallisiert, Ausb. 1.78 g (75% d. Th.), Schmp. 104–106^{4a)}.

N-PhMF-*L*-Asparaginsäure-diäthylester: Die Suspension von 1.13 g *L*-Asparaginsäure-diäthylesterhydrochlorid in 5 ccm trockenem Chloroform wird mit 0.52 ccm Diäthylamin unter Eiskühlung bis zur Lösung geschüttelt und mit 15 ccm trockenem Äther das Diäthylaminhydrochlorid (0.56 g) ausgefällt. Die Mutterlauge wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand (0.97 g Asparaginsäure-diäthylester) unter Eiskühlung mit der Lösung von 0.43 g PhMF-Chlorid in 5 ccm Chloroform versetzt. Die Lösung wird über Nacht im Eisschrank stengelassen, wie oben ausgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Ausb. 0.62 g (74% d. Th.), Schmp. 40–43°.

$C_{15}H_{19}O_5NS$ (325.2) Ber. N 4.31 Gef. N 4.60

N-PhMF-*L*-Asparaginsäure-anhydrid: 0.5 g *N*-PhMF-Asparaginsäure-diäthylester werden mit der Mischung von 1 ccm Eisessig und 0.5 ccm konz. Salzsäure 30 Min. bei 120° gekocht, i. Vak. zur Trockene gedampft, der Rückstand (0.46 g) mit 4.5 ccm Acetanhydrid 10 Min. bei 110° erwärmt, danach i. Vak. eingedampft. Der Rückstand (0.51 g) wird mit 3 ccm Äther abgesaugt. 0.22 g. Schmp. 152–153°. Aus absol. Benzol kristallisieren 0.18 g (41% d. Th.), Schmp. 153–154°. $[\alpha]_D^{25}$: +30° (*c* = 1, in Dioxan).

$C_{11}H_9O_4NS$ (251.1) Ber. N 5.53 Gef. N 5.51

N-PhMF-*threo*-β-*D,L*-Phenylserin-äthylester: Die Lösung von 4.18 g *threo*-β-*D,L*-Phenylserin-äthylester in 10 ccm Chloroform wird unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1.72 g PhMF-Chlorid in 35 ccm Chloroform versetzt. Die Lösung wird über Nacht im Eisschrank stengelassen, mit 2*n* HCl und Wasser ausgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. 2.96 g Kristalle, Schmp. 119 bis 122°. Aus Benzol kristallisieren 2.77 g (80% d. Th.), Schmp. 123–124° (Zers.).

$C_{18}H_{19}O_4NS$ (345.2) Ber. S 9.30 Gef. S 9.35

N-PhMF-*D,L*-Phenylalanin-äthylester: Aus 6.3 g *D,L*-Phenylalanin-äthylester in 40 ccm Chloroform und 2.7 g PhMF-Chlorid in 5 ccm Chloroform, wie oben beschrieben. 4.49 g Rückstand wird aus 0.5 ccm Methanol und 5 ccm Petroläther umkristallisiert: Ausb. 1.45 g (28% d. Th.), Schmp. 66–68°.

$C_{18}H_{19}O_3NS$ (329.2) Ber. N 4.26 Gef. N 4.10

Umsetzung von *N*-PhMF-Glycylchlorid mit Diazomethan: 3.6 g *N*-PhMF-Glycin werden mit 12 ccm Thionylchlorid 10 Min. bei 60° gehalten, der Überschuss

⁶⁾ P. Karrer u. M. dalla Vedova, Helv. chim. Acta 11, 368 [1928].

an Thionylchlorid i. Vak. verjagt, der krist. Rückstand mit Petroläther ausgewaschen und i. Vak. getrocknet. Die so hergestellten 3.04 g des reinen Säurechlorids werden sofort in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst, tropfenweise zu 200 ccm ätherischer Diazomethanlösung, welche 4 g Diazomethan enthält, gegeben. Die Lösung wird über Nacht in den Eisschrank gestellt, von den ausgeschiedenen Kristallen abgesaugt, die mit wenig absol. Äther gewaschen werden. Ausb. 1.17 g, Schmp. 117–119° (Zers.). Zur Überführung ins Chlorketon werden 0.71 g in 5 ccm Tetrahydrofuran gelöst und unter Eiskühlung mit der Mischung von 2 ccm 18-proz. alkohol. Salzsäure und 2 ccm Tetrahydrofuran versetzt. Es entwickeln sich 70 ccm Gas (etwa theoret. Menge). Nach 44stdg. Stehenlassen im Eisschrank wird i. Vak. zur Trockene verdampft und der Rückstand mit 5 ccm Äther abgesaugt: 0.46 g hellgelbe Kristalle, Schmp. 100–101°.

$C_{10}H_{10}O_2NCIS$ (243.5) Ber. N 5.8 Cl 14.6 Gef. N 5.8 Cl 15.2

N-PhMF- α -L-Glutamyl-L-tyrosin-äthylester: Die Lösung von 1.05 g L-Tyrosin-äthylester in 200 ccm Chloroform wird mit 1.32 g *N*-PhMF-L-Glutaminsäure-anhydrid versetzt. Aus der klaren Lösung scheiden sich langsam farblose Kristalle aus. Die Mischung wird über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen, die Kristalle abgesaugt und mit Chloroform gewaschen. Nach dem Trocknen 1.12 g, Schmp. 182 bis 183° (47% d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: -36° ($c = 1$, in Alkohol).

$C_{23}H_{26}O_7N_2S$ (474.2) Ber. N 5.91 Gef. N 5.96

N-PhMF- α -L-Glutamyl-glycin-äthylester: Die Lösung von 0.1 g Glycin-äthylester in 10 ccm Chloroform wird mit 0.26 g *N*-PhMF-L-Glutaminsäure-anhydrid versetzt. Die klare Lösung wird über Nacht im Eisschrank stengelassen, danach mit 5 ccm Petroläther versetzt. Es scheiden sich 0.23 g Kristalle aus, die, aus 3 ccm Chloroform und 3 ccm Petroläther umkristallisiert, 0.21 g (58% d. Th.) vom Schmp. 72–74° (Zers.) ergeben.

$C_{16}H_{20}O_6N_2S$ (368.2) Ber. N 7.61 Gef. N 7.68

N-PhMF-Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester: Aus 1.4 g DL-Phenylalanin-äthylester in 5 ccm Chloroform und 0.82 g *N*-PhMF-Glycylchlorid (Darstellung aus *N*-PhMF-Glycin mit Thionylchlorid) in 20 ccm Chloroform. In gewohnter Weise aufgearbeitet, erhält man 1.2 g; aus 2 ccm absol. Alkohol kristallisieren 0.55 g vom Schmp. 100–105°; noch einmal aus 3 ccm absol. Alkohol: 0.42 g (30% d. Th.), Schmp. 104–106°.

$C_{20}H_{22}O_4N_2S$ (386.2) Ber. N 7.28 Gef. N 7.64

Reaktion von *N*-PhMF-Glycin-äthylester mit Hydrazinhydrat: Die Lösung von 0.18 g *N*-PhMF-Glycin-äthylester in 2 ccm absol. Alkohol wird mit 0.08 ccm 50-proz. Hydrazinhydrat-Lösung versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur erhält man 0.04 g krist. Carbonyldiglycin-dihydrazid, Schmp. 152–155° (Zers.). Mit Alkohol ausgekocht, 0.02 g, Schmp. 155–157°.

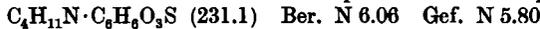
$C_6H_{12}O_3N_6$ (204.1) Ber. N 41.18 Gef. N 40.84

Abbau von *N*-PhMF-Glycin: a) 0.5 g *N*-PhMF-Glycin werden mit 5 ccm Eisessig und 2.5 ccm 30-proz. Wasserstoffperoxyd 80 Min. auf siedendem Wasserbad erwärmt und i. Vak. zur Trockene verdampft. Der Rückstand (0.59 g) wird mit 5 ccm Wasser 1 Stde. auf dem Wasserbad hydrolysiert, danach mit 0.8 ccm 10*n* NaOH alkalisch gemacht und mit 0.2 ccm Benzoylchlorid geschüttelt. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure werden 0.19 g krist. Hippursäure (44% d. Th.) erhalten; Schmp. und Misch-Schmp. 184–187°.

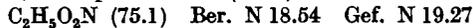
b) 4.22 g *N*-PhMF-Glycin werden, in 80 ccm Eisessig gelöst, mit 120 ccm einer Lösung von 5.83 g Benzopersäure in Benzol 1.5 Stdn. bei 0° stengelassen. Die Lösung wird i. Vak. bei 40° eingedampft, der krist. Rückstand in 40 ccm Wasser 30 Min. bei 50° gehalten, nach Abkühlung mit Äther die Benzoesäure ausgeschüttelt, danach auf eine Anionenaustauschersäule von 5 g Amberlite IR4B, die vorher mit 2-proz. Ammoniak und Wasser ausgewaschen worden war, gegossen. Die Säule wird mit 10 ccm Wasser ausgewaschen, danach der vereinigte Durchlauf i. Vak. eingedampft. Ausb. 1.75 g krist. Glycin. Mit 3 ccm Alkohol abgesaugt, Ausb. 1.1 g (73% d. Th.), Schmp. 244–245° (Zers.).

$C_2H_5O_2N$ (75.1) Ber. N 18.54 Gef. N 18.50

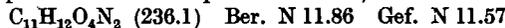
Die Säule wird danach mit 2*n* HCl ausgewaschen und das Waschwasser i. Vak. eingedampft: Rückstand 1.71 g, Schmp. 46–48°. Mit Benzol abgesaugt, 1.15 g vom Schmp. 51–52°. 1.12 g davon werden in 4 ccm absol. Alkohol gelöst und 0.75 ccm Diäthylamin dazugegeben. Nach Eiskühlung scheiden sich 1.35 g des Diäthylaminsalzes der Benzolsulfonsäure in Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 137–139° aus.



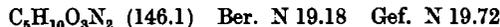
c) In die Lösung von 1 g *N*-PhMF-Glycin in 100 ccm Essigester leitet man bei –70° 12 mMol 3-proz. Ozon innerhalb von 4 Stdn. unter Rühren ein. Die Lösung bleibt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und wird dann vorsichtig i. Vak. zur Trockene gedampft: 1.84 g Kristalle, die durch 2stdg. Erwärmen mit 20 ccm Wasser auf dem Wasserbad (bis zur negativen Kaliumjodid-Reaktion) unter Gas-Entwicklung in Lösung gehen. Beim Abkühlen scheidet sich ein kristallisierendes Öl aus: 0.12 g, Schmp. 50–53°. Der wäßrige Teil wird mit Essigester ausgewaschen (Rückstand 0.12 g Ausgangsmaterial) und danach i. Vak. eingedampft. Der Rückstand liefert aus wäßr. Alkohol 0.18 g (50% d. Th.) krist. Glycin, Schmp. 225–228° (Zers.).



Benzoyl-glycyl-glycin: Die Lösung von 1.45 g *N*-PhMF-Glycyl-glycin-äthylester in 30 ccm Eisessig wird mit einer Lösung von 1.58 g Benzopersäure in 40 ccm Benzol 1.5 Stdn. bei 0° stengelassen, i. Vak. bei 40° eingedampft, der Rückstand 30 Min. auf 50° erwärmt, die Benzoesäure mit Äther ausgeschüttelt, die wäßr. Lösung mit 3.5 ccm 10 *n* NaOH $\frac{1}{2}$ Stde. bei 0° stengelassen, mit 0.75 ccm Benzoylchlorid und 2 ccm 10 *n* NaOH geschüttelt. Nach dem Ausschütteln mit 10 ccm Äther werden durch Ansäuern mit konz. Salzsäure 0.6 g rohes Hippurylglycin gewonnen. Aus Alkohol kristallisiert, Schmp. und Misch-Schmp. 210–210.5°¹⁰).



Glycyl-DL-alanin: Die Lösung von 0.6 g *N*-PhMF-Glycyl-DL-alanin-methylester⁹) in 10 ccm Eisessig wird mit einer Lösung von 0.715 g Benzopersäure in 17 ccm Benzol 1 Stde. bei 0° stengelassen, i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit 6 ccm Wasser 30 Min. bei 50° gehalten, mit Äther ausgeschüttelt und auf eine Amberlite-IR4B-Säule (aus 5 g, mit 2-proz. Ammoniak und Wasser gewaschen) gegossen. Die durchgelaufene Lösung wird mit 2.5 ccm *n*NaOH 1 Stde. bei 0° gehalten, danach auf eine Dowex-50-Säule (aus 5 g, mit *n*HCl und Wasser gewaschen) gegossen. Rückstand des Ablaufes 0.07 g, Schmp. 216–220° (Zers.). Die Säule wird danach mit 20 ccm 2-proz. Ammoniak gewaschen, das Eluat i. Vak. eingedampft, der amorphe Rückstand (0.15 g) aus Alkohol kristallisiert. 0.07 g, Schmp. 231–233° (Zers.). R_F 0.57 in Phenol-Wasser¹¹). Gesamt-ausb. 48% d. Theorie.



α -L-Glutamyl-L-tyrosin: Wie oben aus 1.12 g *N*-PhMF- α -L-Glutamyl-L-tyrosin-äthylester in 22 ccm Eisessig und 0.84 g Benzopersäure in 23 ccm Benzol. Die Aufarbeitung erfolgt wie vorher unter Verwendung der 3fachen Mengen Wasser, *n* NaOH und 2-proz. Ammoniak. Ausb. 0.32 g Kristalle, Schmp. 165–166° (Zers.), die in 5 ccm Wasser gelöst und mit 75 ccm Alkohol über Nacht im Eisschrank stengelassen werden. Ausb. 0.21 g (30% d. Th.), Schmp. 180–181° (Zers.). R_F 0.41 in Phenol-Wasser. $[\alpha]_D^{20}$: +21° ($c = 1$, in Wasser, enthaltend 1 Mol. Salzsäure¹²)).



¹⁰) E. Fischer, Ber. dtsh. chem. Ges. 38, 608 [1905].

¹¹) R. Conden, A. H. Gordon u. A. J. P. Martin, Biochem. J. 41, 590 [1947].

¹²) M. Bergmann, L. Zervas, L. Salzmann u. H. Schleich, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 224, 17 [1934].