

Piergiorgio Pietta, Francesco Chillemi und Arnaldo Corbellini

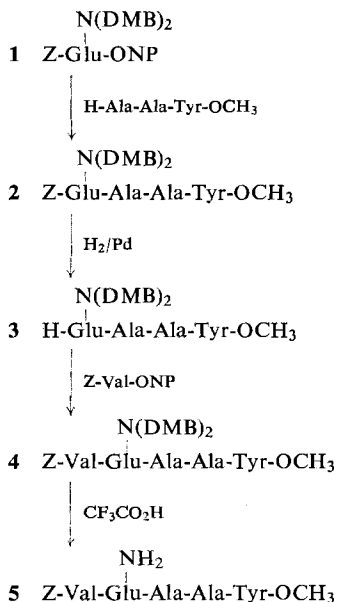
## Notiz zum Schutz der Carbonamidgruppe des Glutamins bei Peptidsynthesen durch 2.4-Dimethoxy-benzyl-Reste

Aus dem Istituto Chimica Organica, Facoltà di Agraria, Milano, Italien

(Eingegangen am 10. April 1968)

Von Weygand, Steglich und Mitarbb.<sup>1)</sup> wurde als Schutzgruppe für Säureamidfunktionen der 2.4-Dimethoxy-benzyl-Rest eingeführt. Durch ihn wird bei Asparaginy- und Glutaminy-Verbindungen die Dehydratisierung zu Cyanverbindungen sowie die intramolekulare Imidbildung bei Peptidsynthesen vermieden.

Peptide mit aminoendständigem Glutamin neigen zur Pyroglutaminbildung<sup>2)</sup>. Hierauf beruht die geringe Stabilität derartiger Verbindungen<sup>3-5)</sup>. Auch bei der Synthese von Glutaminy-peptiden ist die Pyroglutaminbildung stets eine unerwünschte Nebenreaktion, weil sie die Ausbeuten vermindert<sup>6,7)</sup> und zu schwer abtrennbaren Nebenprodukten führt.



Abkürzung: DMB = 2.4-Dimethoxy-benzyl.

- 1) F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar und N. M. Khan, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 3483; F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar und N. Chytil, *Chem. Ber.* **101**, 3623 (1968); F. Weygand, W. Steglich und J. Bjarnason, *ebenda* **101**, 3642 (1968), vorstehend.
- 2) J. B. Gilbert, V. E. Price und J. P. Greenstein, *J. biol. Chemistry* **180**, 209 (1949).
- 3) J. Rudinger und Z. Pravda, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **23**, 1947 (1958).
- 4) F. Chillemi, *Gazz. chim. ital.* **93**, 1079 (1963).
- 5) F. Chillemi, L. Bernardi und G. Bosisio, *Gazz. chim. ital.* **94**, 891 (1964).
- 6) D. Theodoropoulos, VII<sup>th</sup> Europ. Peptide Symposium Budapest, Sept. 1964.
- 7) E. Schnabel, H. Klostermeyer, J. Dahlmans und H. Zahn, *Liebigs Ann. Chem.* **707**, 227 (1967).

Bei der Synthese von Peptiden der menschlichen Hämoglobin- $\beta$ -Kette haben wir beobachtet, daß sich schon bei der Hydrogenolyse von Z-Gln-Ala-Ala-Tyr-OCH<sub>3</sub> in 80proz. Essigsäure eine geringe Menge an pyro-Glu-Ala-Ala-Tyr-OCH<sub>3</sub> bildet. Läßt man die Lösung drei Tage stehen, so erfolgt vollständige Umwandlung in den Proglutaminyl-peptidester. Er wurde auch zu etwa 30% bei der Umsetzung von Z-Val-ONP mit Gln-Ala-Ala-Tyr-OCH<sub>3</sub> gebildet, weshalb die Ausbeute an Pentapeptid-Derivat nur 60% betrug.

Durch den Schutz der Carbonamidgruppe des Glutamins mit zwei 2,4-Dimethoxy-benzyl-Resten konnte das Tetrapeptidderivat **3** als vollkommen stabile Verbindung erhalten werden. Aus ihm ließ sich in 90proz. Ausbeute das Pentapeptid-Derivat **4** gewinnen. Die Abspaltung der 2,4-Dimethoxy-benzyl-Reste unter Erhalt des *N*-Benzyloxycarbonyl-Restes erfolgte mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von Anisol (12 Stdn. bei 20°). Die Ausbeute an **5** war fast quantitativ, und die erhaltene Verbindung stimmte in allen Eigenschaften mit der auf anderem Wege gewonnenen<sup>8)</sup> überein.

### Beschreibung der Versuche

Zum Entwickeln der Dünnschichtchromatogramme auf Silicagel G (Merck) dienten die Lösungsmittelgemische A: Benzol/Essigester/Essigsäure/Wasser (10:10:4:2 vol) und B: *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1 vol). Papierlektrophoresen wurden mit der Apparatur von Wieland und Pfeleiderer<sup>9)</sup> ausgeführt, wobei Ameisensäure/Essigsäure/Wasser (15:10:75 vol) (pH 1.9) verwendet wurde.  $E_{1,9} = 1.07$  Leu bedeutet, daß bei pH 1.9 die zu prüfende Substanz 1.07 mal schneller wandert als Leucin. Die geschützten Peptide wurden mit Natriumhypochlorit und Kaliumjodid-Stärke-Paste bzw. mit  $\alpha$ -Nitroso- $\beta$ -naphthol und Salpetersäure sichtbar gemacht.

*N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- $\alpha$ -[*p*-nitro-phenylester]- $\gamma$ -[bis-(2,4-dimethoxy-benzyl)-amid] (**1**): Aus *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -[bis-(2,4-dimethoxy-benzyl)-amid]<sup>1)</sup> nach Bodanszky und du Vigneaud<sup>10)</sup>. Ausb. 68%, Schmp. 81–82° (Äthanol),  $[\alpha]_D^{20}$ : –11.6° ( $c = 1$  in DMF).

C<sub>37</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub> (701.7) Ber. C 63.32 H 5.60 N 5.98 Gef. C 63.28 H 5.64 N 5.96

*N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutamyl[ $\gamma$ -bis-(2,4-dimethoxy-benzyl)-amid]-*L*-alanyl-*L*-alanyl-*L*-tyrosin-methylester (**2**): 1.41 g (3 mMol) *Z*-Ala-Ala-Tyr-OCH<sub>3</sub><sup>8)</sup> wurden in 25 ccm Eisessig mit 400 mg 10proz. Pd/C der Hydrogenolyse unterworfen. Der nach Abtrennen des Katalysators und Einengen i. Vak. erhaltene Rückstand wurde in 20 ccm Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 2.17 g (3.1 mMol) **1** und 0.42 ccm Triäthylamin ließ man 48 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand sorgfältig mit Äther gewaschen. Aus 80proz. Essigsäure 2.1 g (78%) reines **2**, Schmp. 166–167°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –2.0° ( $c = 1$  in DMF),  $R_F$  (A) 0.82. Aminosäureanalyse: Glu 1.0, Ala 2.08, Tyr 0.48, NH<sub>3</sub> 1.0.

C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub> (900.0) Ber. C 62.69 H 6.42 N 7.80 Gef. C 62.72 H 6.39 N 7.78

*L*-Glutamyl-[ $\gamma$ -bis-(2,4-dimethoxy-benzyl)-amid]-*L*-alanyl-*L*-alanyl-*L*-tyrosin-methylester (**3**): 0.3 g **2** wurden in 15 ccm Eisessig mit 0.1 g 10proz. Pd/C hydrogenolysiert. Nach Waschen mit Äther aus Methanol/Äther Schmp. 104–106°,  $[\alpha]_D^{20}$ : 1.1° ( $c = 1$  in DMF),  $R_F$  (B) 0.56,  $E_{1,9} = 0.31$  Leu.

C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>]CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> (825.9) Ber. C 59.65 H 6.71 N 8.48 Gef. C 59.87 H 6.50 N 8.40

*N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-valyl-*L*-glutamyl[ $\gamma$ -bis-(2,4-dimethoxy-benzyl)-amid]-*L*-alanyl-*L*-alanyl-*L*-tyrosin-methylester (**4**): Durch Hydrieren von 0.48 g (0.53 mMol) **2** in 15 ccm Eis-

<sup>8)</sup> A. Corbellini, F. Chillemi und P. Pietta, Gazz. chim. ital. **97**, 514 (1967).

<sup>9)</sup> Th. Wieland und G. Pfeleiderer, Angew. Chem. **67**, 257 (1955).

<sup>10)</sup> M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

essig mit *Pd/C* wurde der *Z*-Rest abgespalten. Danach wurde in 10 ccm Pyridin mit 0.22 g (0.58 mMol) *Z-Val-ONP* und 0.074 ccm *Triäthylamin* versetzt. Nach 48 Stdn. wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand nach Waschen mit Äther aus Methanol umkristallisiert: Ausb. 0.48 g (90 %), Schmp. 196–197°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-4.4^\circ$  ( $c = 1$  in DMF),  $R_F$  (A) 0.75.

$C_{52}H_{66}N_6O_{14}$  (999.2) Ber. C 62.51 H 6.65 N 8.41 Gef. C 62.47 H 6.69 N 8.39

*N-Benzoyloxycarbonyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-alanyl-L-alanyl-L-tyrosin-methylester* (5): 0.1 g **4** wurden mit 2 Tropfen Anisol in 2–3 ccm *Trifluoressigsäure* 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurde Toluol nachdestilliert und der Rückstand mit Äther gewaschen. Aus Dimethylformamid/Äthanol 0.065 g, Schmp. 244–246°,  $R_F$  (A) 0.28 wie authent. Vergleichsmaterial<sup>8)</sup>.

*L-Pyroglutamyl-L-alanyl-L-alanyl-L-tyrosin-methylester*: 0.6 g *Z-Gln-Ala-Ala-Tyr-OCH<sub>3</sub>*<sup>8)</sup> wurden mit *Pd/C* in 80proz. Essigsäure hydrogenolysiert. Nach Waschen mit Äther zeigte die *Z*-freie Verbindung  $R_F$  (B) 0.33 und  $E_{1.9}$  0.49 Leu.

Beim 3-tägigen Stehenlassen in 10 ccm 80proz. Essigsäure verwandelte sie sich vollständig in die *Pyroglutamyl-Verbindung*. Aus 95proz. Äthanol/Äther Schmp. 174–175°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $4.8^\circ$  ( $c = 1$  in DMF),  $E_{1.9}$  0.0 Leu.

$C_{21}H_{28}N_4O_7 \cdot H_2O$  (466.5) Ber. C 54.07 H 6.49 N 12.02 Gef. C 54.71 H 6.24 N 12.02  
[152/68]