

215. Aminodiacylhydrazin-Umlagerung Ein weiteres neues Aufbauprinzip in der Peptidsynthese

1. Mitteilung

Umlagerung von N-(Carbobenzoyglycyl-glycyl)-N'-(phenylalanyl)- hydrazin in Carbobenzoyglycyl-glycyl-phenylalanin-hydrazid

von M. Brenner und W. Hofer

(22. IX. 61)

Aminosäuren an einem Peptidverband können eine aussergewöhnliche intramolekulare Reaktionsfreudigkeit besitzen. Nucleophile Reaktionen an Carbonyl-Kohlenstoffatomen verlaufen unter Umständen erheblich beschleunigt. Massgebend sind im wesentlichen die sterischen Verhältnisse. Bei Berücksichtigung dieses Sachverhaltes eröffnen sich der Peptidsynthese prinzipiell neue Wege. Beispiele sind die Aminoacyl-Einlagerungsreaktion¹⁾ und die Aminodiacylimid-Umlagerung²⁾. Erstere bietet die Möglichkeit N-endständiger oder ketteninterner, letztere die Möglichkeit C-endständiger Vergrösserung beidseitig geschützter Peptidketten. Diesen nicht klassischen³⁾ Reaktionsschemen ist gemeinsam, dass die einzuführende Aminosäure zunächst über ihre Carboxylgruppe an einen Akzeptor gebunden wird, welcher selbst Bestandteil des zu vergrössernden geschützten Peptides ist. Als Akzeptor fungiert bei der Aminoacyleinlagerung zum Beispiel der Salicylrest (N-endständig) oder der Serylrest (kettenintern), während TH. WIELAND²⁾ C-endständig eine Amidgruppe verwendet. Der am Akzeptor haftende Aminoacylrest wird in einem zweiten Reaktionsschritt, als Folge einer Umlagerung, Bestandteil der nun um ein Glied verlängerten geschützten Kette; gleichzeitig wird der Akzeptor für einen nächsten Reaktionszyklus freigegeben.

Die präparative Anwendung einer solchen Konzeption erfordert die Erfüllung von vier Voraussetzungen:

a) Das Ausgangsmaterial mit dem eingebauten Akzeptor muss leicht zugänglich sein.

b) Die Einführung der Aminosäure in den Akzeptor muss ohne störende Nebenreaktion verlaufen; es muss insbesondere ein zu frühzeitiges Einsetzen der Umlagerungsreaktion verhindert werden können.

c) Die Umlagerungsbedingungen müssen Nebenreaktionen ausschliessen (z. B. Spaltung der Aminoacyl/Akzeptor-Bindung oder Racemisierung).

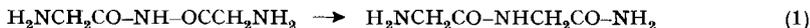
¹⁾ M. BRENNER, J. P. ZIMMERMANN, J. WEHRMÜLLER, P. QUITT, A. HARTMANN, W. SCHNEIDER & U. BEGLINGER, *Helv.* **40**, 1497 (1957); M. BRENNER, *J. cellular comparat. Physiol.*, Suppl. **1** to Vol. **54** (1959).

²⁾ TH. WIELAND & H. MOHR, *Liebigs Ann.* **599**, 222 (1956); TH. WIELAND & H. URBACH, *ibid.* **613**, 84 (1958).

³⁾ Zur klassischen Peptidsynthese vgl. z. B. W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **13**, 444 (1956); M. GOODMAN & G. W. KENNER, *Advances Protein Chemistry* **12**, 465 (1957).

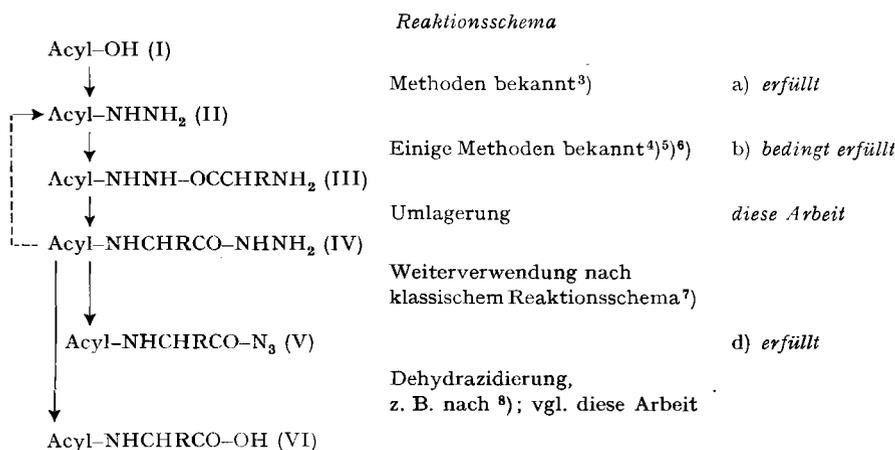
d) Der Akzeptor darf im Endprodukt der Synthese nicht stören, muss also zum Beispiel leicht entfernbar sein.

Mit der C-endständigen Amidgruppe als Akzeptor ist Voraussetzung a) erfüllt; ebenso c), indem z. B. die Reaktion (1) unter geeigneten Bedingungen recht glatt abläuft²⁾.



Andererseits aber ist die Amidogruppe nur schwer aminoacylierbar, und als Bestandteil des Synthese-Endproduktes kann sie stören.

Ein Vergleich der bekannten Eigenschaften von Amid- und Hydrazid-Gruppe lässt nun sofort erkennen, dass beim Ersatz von C-endständigem $-\text{NH}_2$ durch C-endständiges $-\text{NHNH}_2$ ausser Voraussetzung a) auch b) und d) erfüllt werden. Es erschien somit angezeigt, die Umlagerungsfähigkeit von N-Acyl-N'-aminoacylhydrazinen (III) in Acylaminosäurehydrazide (IV) zu untersuchen und so die Realisierung der nachstehend dargestellten Reaktionsfolge abzuklären. Zur Verdeutlichung haben wir neben jeden geforderten Reaktionsschritt einen kurzen Kommentar gesetzt.



Der Übergang von III zu IV – im weitern Sinn eine Variante der Aminoacyl-Einlagerungsreaktion¹⁾ – ist durchführbar. Er sei als Aminodiacylhydrazin-Umlagerung bezeichnet und am Beispiel IIIa \rightarrow IVa beschrieben.

N-(Cbzo-glycyl-glycyl)-N'-(phenylalanyl)-hydrazin (IIIa)⁸⁾ ist in Wasser (Bedingungen der WIELAND'schen Aminodiacylimid-Umlagerung²⁾) sowie in neutralen und basischen organischen Lösungsmitteln beständig. In Gegenwart organischer Säuren aber, insbesondere in Mischungen von Eisessig, Propionsäure oder Pivalinsäure mit einem Lösungsmittel wie Dioxan, Tetrahydrofuran, 1,2-Dimethoxyäthan, Dimethyl-

⁴⁾ K. HOFMANN, A. LINDENMANN, M. Z. MAGEE & N. H. KHAN, J. Amer. chem. Soc. 74, 470 (1952).

⁵⁾ A. WINTERSTEIN, B. HEGEDÜS, B. FUST, E. BÖHNI & A. STUDER, Helv. 39, 229 (1956).

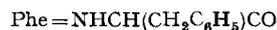
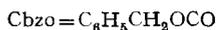
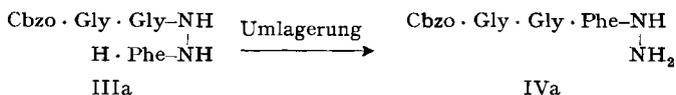
⁶⁾ ST. GUTTMANN, Helv. 54, 721 (1961).

⁷⁾ Vgl. z. B. bei ³⁾.

⁸⁾ M. E. KAHANE & O. SACKUR, Ann. pharmac. franç. 17, 175 (1953).

⁹⁾ Zur Herstellung vgl. 2. Mitteilung dieser Reihe: M. BRENNER & W. HOFER, Helv. 44, 1798 (1961).

formamid, Dimethylacetamid oder Pyridin, lagert es sich um. In einer Reaktion erster Ordnung entsteht, unter optimalen Bedingungen praktisch quantitativ, Cbzo-glycyl-glycyl-phenylalanin-hydrazid (IVa).

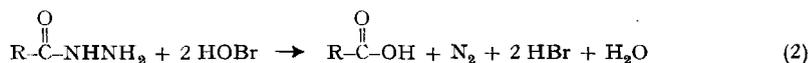


Auffällig ist eine ausgeprägte Abhängigkeit der Umlagerungsgeschwindigkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittels. Das optimale Mischungsverhältnis und der maximale Wert der Geschwindigkeitskonstanten variieren mit der Säure und dem Verdünnungsmittel. Tabelle I enthält als Beispiel einige Geschwindigkeitskonstanten für den Umsatz IIIa \rightarrow IVa im System Dioxan/Eisessig bei 40°.

Tabelle I. *Scheinbare Reaktionskonstanten 1. Ordnung*, berechnet unter Vernachlässigung der bei höherer Eisessig-Konzentration auftretenden Gegenreaktion, vgl. Text

% Eisessig (v/v)	$k \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$	% Umsatz bei Versuchs- abbruch	% Eisessig (v/v)	$k \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$	% Umsatz bei Versuchs- abbruch
0	0	0	25	4,5	55
2,5	5,9	56	35	2,8	20
5	9,1	71	50	1,6	17
8	10,3	62	75	0,7	5
10	9,9	94	100	0,4	5
20	6,0	57			

Zur quantitativen Verfolgung der Umlagerungsreaktion titrieren wir das mit 2N Schwefelsäure verdünnte Reaktionsgemisch mit Natriumhypobromit¹⁰⁾. Das Umlagerungsprodukt wird nach Gleichung (2) selektiv dehydrazidiert; den Endpunkt erkennt man an der Entfärbung von zugesetztem Methylrot⁸⁾.



Die gleiche Reaktion lässt sich, wie vorläufige Versuche gezeigt haben, zur präparativen Dehydrazidierung von Säurehydraziden verwenden.

Für die qualitative Analyse der Reaktionsgemische eignet sich die Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel G mit Chloroform/Methanol 2:1 oder 3:1 als Fließmittel¹¹⁾ und den in Tabelle II aufgeführten Nachweisreagenzien.

In einem präparativen Versuch (500 mg IIIa, 5 ml Eisessig + 45 ml Dioxan, 14 Std. 40°) erhielten wir nach Eindampfen der Reaktionslösung und einmaligem Umkristallisieren aus Äthanol/

¹⁰⁾ In Gegenwart bromempfindlicher Gruppierungen benützen wir die Ninhydrinreaktion (S. MOORE & W. STEIN, *J. biol. Chemistry* 176, 367 (1948)); III und IV reagieren verschieden, so dass man den Umsatz bei $\lambda = 570 \text{ m}\mu$ anhand einer Eichkurve verfolgen kann.

¹¹⁾ Vgl. z. B. M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960).

Petroläther reines IVa in 91% Ausbeute. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischem Material¹⁶⁾ (Smp., Misch-Smp., Rf-Wert und IR.-Spektrum).

Der Acylrest und die Gruppe R in III lassen sich bei der Aminodiacylhydrazin-Umlagerung in weiten Grenzen variieren¹⁷⁾. Wir werden in späteren Veröffentlichungen darauf zurückkommen. Hier sei nur noch erwähnt, dass Verbindungen mit Acyl = Carbobenzoxycarbonyl⁴⁾ oder *t*-Butyloxycarbonyl⁶⁾ nach bisher vorliegenden Erfahrungen nicht umlagerungsfähig sind¹⁸⁾. – In der zweiten Mitteilung dieser Reihe soll über eine speziell einfache Methode zur Aminoacylierung von Säurehydraziden (II → III) berichtet werden. Sie ist für die präparative Anwendung der Umlagerung besonders bedeutsam.

Tabelle II. Nachweisreagenzien für Hydrazide, Aminodiacylhydrazine und Diacylhydrazine

Reagens	Hydrazide	Amino-diacylhydrazine	Diacylhydrazine
Ninhydrin ¹²⁾	—	gelb, rot, violett	—
Chlor/Tolidin ¹³⁾	blau	blau	blau
0,2% FeCl ₃ in 50-proz. Methanol	—	rot, violett	rot, violett
TOLLENS ¹⁴⁾	braun	—	—
Methylrot/NaOBr ¹⁵⁾	rot	—	—

Nach einer soeben erschienenen Veröffentlichung haben KURTZ & NIEMANN¹⁹⁾ in 0,05N Salzsäure bei 96° die Umlagerung von Acetyltyrosinhydrazid in N-Acetyl-N'-tyrosyl-hydrazin beobachtet. Es handelt sich dabei um eine direkte Umkehrung (IV → III) der Aminodiacylhydrazin-Umlagerung. Wir können die Umkehrbarkeit anhand chromatographischer Analysen eigener Versuche bestätigen. Hippurylglycinhydrazid (IVb) und Acetylphenylalaninhydrazid (IVc) bilden bereits bei 60° in 2N Essigsäure (20 Std.) erhebliche Mengen N-Hippuryl-N'-glycyl-hydrazin (IIIb) bzw. N-Acetyl-N'-phenylalanyl-hydrazin (IIIc). Andererseits entsteht aus IIIb *unter den gleichen Bedingungen* wenig IVb. Ferner ist die in Tab. I dargestellte Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten zwischen 10- und 100-proz. Eisessig nicht einfach einer Blockierung der Aminogruppe von IIIa durch Protonierung zuzuschreiben. Sie ist zusätzlich eine Folge der Gegenreaktion IVa → IIIa; in 100-proz. Eisessig werden beispielsweise innert 4 Std. bei 40° aus IVa erhebliche Mengen IIIa gebildet. Die amerikanischen Autoren formulieren ein Gleichgewicht zwischen III und IV und

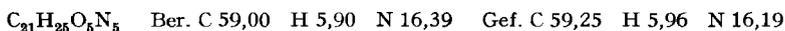
¹²⁾ 1,5 g Ninhydrin in 15 ml Eisessig + 500 ml n-Butylalkohol.

¹³⁾ F. REINDEL & W. HOPPE, Chem. Ber. 87, 1103 (1954); vgl. M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, Experientia 17, 145 (1961).

¹⁴⁾ 0,5 ml 0,1N AgNO₃ + 0,5 ml 2N NaOH + 2N NH₃ bis gelöst, mit H₂O aufgefüllt auf 40 ml.

¹⁵⁾ a) 0,05% Methylrot in 2N H₂SO₄; b) 0,1N NaOBr; vgl. ⁶⁾.

¹⁶⁾ 4,20 g Carbobenzoxycyclyl-glycyl-DL-phenylalanin-äthylester (G. W. ANDERSON *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 78, 2126 (1956)) wurden mit 25 ml Methanol und 1 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 24stdg. Stehen bei 35°, Einengen und Kristallisation aus Äthanol/Petroläther resultierten 2,48 g Carbobenzoxycyclyl-glycyl-phenylalanin-hydrazid, Smp. 203–206°. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert und bei 80°/0,01 Torr 14 Std. über P₂O₅ getrocknet. Smp. 206–207°.



¹⁷⁾ Schweiz. Patentanmeldung, G. Nr. 8630/60 vom 28. 7. 60.

¹⁸⁾ Versuche von M. SCHEER, unveröffentlicht.

¹⁹⁾ A. N. KURTZ & C. NIEMANN, J. Amer. chem. Soc. 83, 3309 (1961).

schreiben die von ihnen in Salzsäure ausschliesslich beobachtete Reaktionsrichtung IV \rightarrow III der stärkeren Basizität von III zu. Ist die treibende Kraft bei der KURTZ-NIEMANN-Reaktion eine Versalzung von III, so ist sie in unserem Fall wahrscheinlich durch den Unterschied im Energieinhalt von zwei N-N'-gekoppelten Amidgruppen und zwei nicht gekoppelten Amidgruppen gegeben²⁰). Offenbar aber erheischt die Umsetzung in beiden Richtungen ausser einer treibenden Kraft noch katalysierende Wechselwirkungen mit dem Reaktionsmilieu. Ergänzend sei in diesem Zusammenhang noch folgende Beobachtung erwähnt: IIIb bleibt in Wasser unverändert, bildet aber in 10-proz. Kaliumhydrogencarbonatlösung Spuren von IVb und in 2N Sodalösung neben Spaltprodukten viel IVb (37°, 18 Std.).

Ob der Mechanismus in saurem und basischem Milieu identisch ist und ob Hin- und Rückreaktion über dieselben Zwischenstufen verlaufen, bleibt unserer Ansicht nach vorläufig offen.

Zur Durchführung dieser Arbeiten standen uns Mittel aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes und seitens der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, zur Verfügung, für die wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus N-geschützten Aminosäurehydraziden kann man N-geschützte Dipeptidhydrazide erhalten, aus diesen N-geschützte Tripeptidhydrazide usw., indem man den NH₂-Stickstoff der Hydrazidgruppe jeweils mit einer α -Aminosäure acyliert und das gebildete Aminodiacylhydrazin einer Umlagerung unterwirft. Für diesen neuen Umlagerungstypus wird die Bezeichnung Aminodiacylhydrazin-Umlagerung vorgeschlagen.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

²⁰) Vgl. z. B. F. ARNDT, L. LÖWE & I. ERGENER, Rev. Fac. Sci. Istanbul 13, 110 (1948).

216. Aminodiacylhydrazin-Umlagerung

2. Mitteilung¹⁾

Herstellung von N-(Acyl)-N'-(α -aminoacyl)-hydrazinen aus Säurehydraziden und N-Carboxyanhydriden von α -Aminosäuren

von M. Brenner und W. Hofer

(23. IX. 61)

N-(Acyl)-N'-(α -aminoacyl)-hydrazine (im folgenden kurz α -Aminodiacylhydrazine genannt) sind Ausgangsmaterialien zur Gewinnung von Acylaminosäurehydraziden¹⁾. Ihre Herstellung kann aus Säurehydraziden und N-geschützten α -Aminosäuren erfolgen. Dabei entsteht zunächst ein α -Aminodiacylhydrazin mit geschützter α -Aminogruppe. Die Schutzgruppe ist anschliessend abzuspalten²⁾). HOFMANN und Mit-

¹⁾ 1. Mitteilung: M. BRENNER & W. HOFER, Helv. 44, 1784 (1961).

²⁾ A. WINTERSTEIN, B. HEGEDÜS, B. FUST, E. BÖHNI & A. STUDER, Helv. 39, 229 (1956); ST. GUTTMANN, Helv. 54, 721 (1961).

³⁾ K. HOFMANN, A. LINDENMANN, M. Z. MAGEE & N. H. KHAN, J. Amer. chem. Soc. 74, 470 (1952).