

Die Formylgruppe als hydrogenolytisch abspaltbare Schutzgruppe für Peptidsynthesen

Von GÜNTER LOSSE und DIETER NADOLSKI

Professor Wolfgang Langenbeck zum 65. Geburtstage gewidmet

Inhaltsübersicht

Durch katalytische Hydrierung in chlorwasserstoffhaltigem Tetrahydrofuran läßt sich die Formylgruppe aus N-Formylaminosäure- und -peptidestern quantitativ abspalten. Die Anwendbarkeit dieser Methode zum Aufbau von Peptiden aus N-Formylaminosäuren wird nachgewiesen.

Die Formylgruppe hat sich, von speziellen Problemen abgesehen, als N-Schutzgruppe in der Peptidchemie nicht sehr durchsetzen können, hauptsächlich wohl, weil N-Formylaminosäuren in bestimmten Fällen zur Racemisierung neigen¹⁾. Dieser Begrenzung der Anwendungsmöglichkeit steht aber neben ihrer bequemen Einführbarkeit²⁾ der große Vorteil, den keine andere N-Schutzgruppe aufweist, gegenüber, daß sie sich nach Herstellung der Peptidbindung auf mannigfache Weise wieder abspalten läßt, nämlich solvolytisch¹⁾³⁾⁴⁾, oxydativ⁵⁾ und, wie wir jetzt fanden, auf dem Wege der katalytischen Hydrierung.

Wir gingen aus von dem Gedanken, daß bei der katalytischen Hydrierung der N-Formylaminosäuren, -peptide bzw. deren Ester primär die N-Methylverbindungen entstehen, welche leicht in Formaldehyd und Aminoverbindung zerfallen⁶⁾. Störende Kondensationsreaktionen des Formaldehydes oder eine Weiterreduktion zur N-Methylverbindung sollte gegebenenfalls

¹⁾ J. C. SHEEHAN u. D. H. YANG, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1154 (1958).

²⁾ V. DU VIGNEAUD, R. DORFMANN u. H. S. LORING, J. biol. Chem. Baltimore **92**, 577 (1932).

³⁾ S. G. WALEY u. J. WATSON, Biochem. J. London **57**, 529 (1954).

⁴⁾ A. HILLMANN u. G. HILLMANN, Z. Naturforsch. Tübingen **6b**, 340 (1951).

⁵⁾ G. LOSSE u. W. ZÖNNCHEN, Angew. Chem. **72**, 385 (1960); Liebigs Ann. Chem. **636**, 140 (1960).

⁶⁾ H. SCHIFF, Liebigs Ann. Chem. **310**, 25 (1900); **319**, 59 (1901).

durch Abfangen der gebildeten Aminogruppe als Salz vermieden werden. Wir haben so zunächst eine Reihe von N-Formylaminosäuren und N-Formylaminosäureestern in verschiedenen Lösungsmitteln an Palladium/Kohle hydriert. Die Ergebnisse mit N-Formylaminosäureestern sind aus Tab. 1 ersichtlich. Untersucht wurden Formyl-glycin-, -alanin-, -valin- und -phenylalaninmethylester.

Tabelle 1
Katalytische Hydrierung von Formylaminosäure-
estern

Lösungs- mittel	mittlere Hydrierzeit	mittlere Wasserstoff- aufnahme	mittlere Ausb. an Ester-hy- drochlorid
Eisessig	3,5 Stunden	175,0%	—
THF	7 Stunden	30,1%	20,2%
THF/HCl	7 Stunden	100,0%	90,1%
Methanol/HCl	30 Stunden	30,2%	88,1%

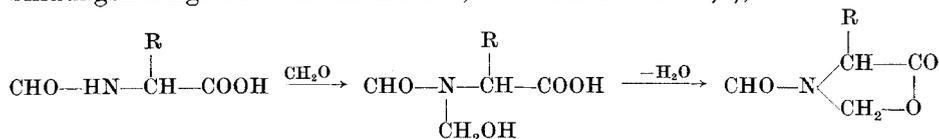
Danach verläuft die Hydrierung in Eisessig unter Aufnahme von mehr als der theoretisch benötigten Menge Wasserstoff relativ rasch, ohne daß aus dem Reaktionsgemisch Aminoester-hydrochlorid isoliert werden kann. Offenbar geht hier die Reaktion über die Oxydationsstufe der N-Methylolverbindung bzw. des Formaldehydes hinaus, indem diese oder sekundäre Reaktionsprodukte des Aldehydes weiter hydriert werden.

Die Hydrierung in Tetrahydrofuran führt bereits zu einer partiellen Abspaltung der Formylgruppe, daneben bilden sich aber beträchtliche Mengen an Kondensationsprodukten. Diese werden vollständig vermieden, wenn die Hydrierung in chlorwasserstoffhaltigen absolutem Tetrahydrofuran ausgeführt und der intermediär auftretende Aminoester als unlösliches Hydrochlorid abgefangen wird. Man gewinnt so nach maximal 7 Stunden, gewöhnlich nach wesentlich kleineren Hydrierzeiten, in fast theoretischer Ausbeute das reine Ester-hydrochlorid.

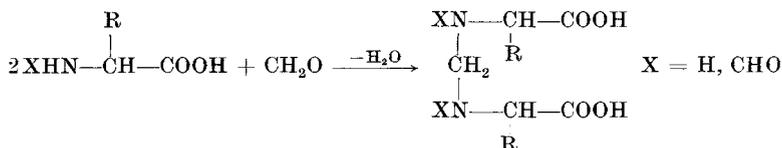
In der Versuchsreihe mit methanolischer Salzsäure liegt, wie aus dem Vergleich von Ausbeute und Wasserstoffaufnahme hervorgeht, keine hydrierende, sondern im wesentlichen die bekannte solvolytische Abspaltung vor^{1) 3) 4)}.

Analoge Versuche mit den freien N-Formylaminosäuren lieferten in keinem Falle die freien Aminosäuren bzw. deren Salze. Hier bilden sich durchweg Nebenprodukte, die als Kondensationsprodukte des Formaldehydes mit

Amino- und Carboxylgruppe der in der Reaktionslösung anwesenden Verbindungen aufgefaßt werden müssen, z. B. Oxazolidone⁷⁾),

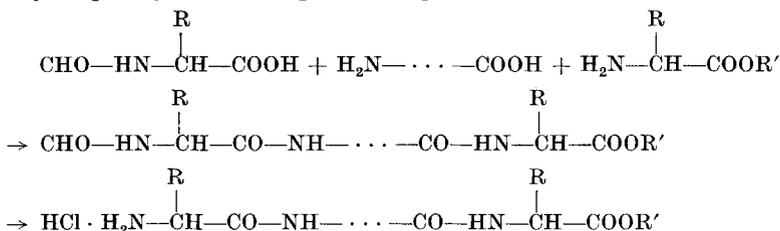


oder Methylen-bis-aminosäuren bzw. Methylen-N-acyl-bis-aminosäuren⁹⁾

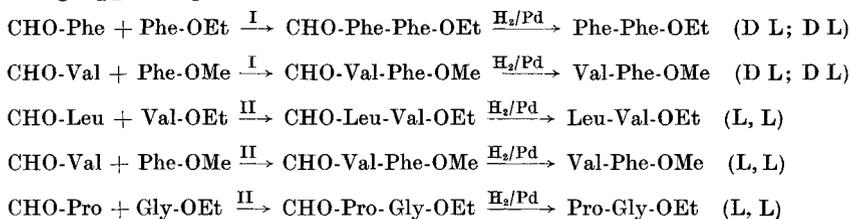


Aus diesem Grunde führt auch die katalytische Hydrierung der N-Formyl-benzylester zu keinem Ergebnis, da die Benzylgruppe primär abgespalten wird und dann die gleichen Nebenreaktionen eintreten.

Aus diesen Modellversuchen ergibt sich, daß die hydrierende Abspaltung der N-Formylgruppe in Tetrahydrofuran/Chlorwasserstoff für Peptidsynthesen dann verwertbar ist, wenn vor diesem Schritt die Carboxylseite durch einen hydrogenolysebeständigen Rest geschützt ist, z. B.



Um diesen Nachweis prinzipiell zu erbringen, haben wir eine Reihe einfacher Dipeptidester unter Anwendung der Methode der gemischten Anhydride (I) bzw. der Carbodiimidmethode (II) und der Alkylestergruppe als C-Schutzgruppe aufgebaut.



⁷⁾ D. BEN-ISHAI, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5736 (1957).

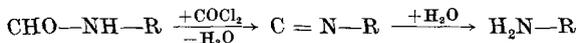
⁸⁾ J. P. GREENSTEIN u. M. WINITZ, Chemistry of the amino acids, New York, London, **2**, 1024 (1961).

⁹⁾ D. FRENCH u. J. T. EDSALL, Advances in Prot. Chem. **2**, 278 (1945).

Derartige Peptidester können z. B. als Kupplungskomponenten für N-geschützte Aminosäuren dienen und dann carboxylseitig nach der Azidmethode weiter verlängert werden.

Diese Versuche sollen im Hinblick auf eine breitere Anwendungsmöglichkeit des Verfahrens und zwecks Prüfung der Konfigurationsstabilität bei der Abspaltungsreaktion weiter fortgesetzt werden.

Eine prinzipiell weitere Möglichkeit, die N-Formylgruppe abzuspalten, müßte in der Umsetzung von N-Formyl-peptidestern mit Phosgen bestehen. Hierbei geht die Formylaminogruppe in die Isonitrilgruppe über¹⁰⁾,



die sich sehr leicht zur freien Aminoverbindung verseifen läßt. Entsprechende Versuche von uns in dieser Richtung führten jedoch zu keinen neuen methodischen Vorteilen.

Beschreibung der Versuche

1. Formylaminosäuren

Die Verbindungen wurden durch Umsetzung der Aminosäuren mit wasserfreier Ameisensäure in Acetanhydrid gewonnen²⁾.

Formyl-glycin	Schmp. 154° ¹¹⁾	
Formyl-DL-alanin	Schmp. 149° ⁵⁾	
Formyl-DL-valin	Schmp. 144–146° ¹²⁾	
Formyl-L-valin	Schmp. 156°	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13,5^\circ$ (abs. Alkohol) ¹³⁾
Formyl-L-leucin	Schmp. 142–144°	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,4^\circ$ (abs. Alkohol) ¹¹⁾
Formyl-L-prolin	Schmp. 122–123°	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,3^\circ$ (abs. Alkohol) ¹²⁾
Formyl-DL-phenylalanin	Schmp. 170° ¹²⁾	

2. Formylaminosäure-methylester¹⁴⁾

Die Formylaminosäure wurde in absol. Methanol gelöst, unter Eiskühlung allmählich mit gesättigter ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt und nach Abziehen des Lösungsmittels durch Kristallisation oder Hochvakuumdestillation gereinigt.

3. Hydrierung der Formylaminosäuren

Jeweils 0,01 Mol Formylaminosäure wurde in folgenden Lösungsmittelmengen gelöst,

- 50 cm³ absol. THF
- 50 cm³ absol. HCl-gesättigtes THF
- 30 cm³ Eisessig
- 60 cm³ absol. HCl-gesättigtes Methanol

¹⁰⁾ I. UGI u. K. MEYER, Chem. Ber. **93**, 239 (1960). — I. UGI u. Mitarb., Chem. Ber. **94**, 2814 (1961).

¹¹⁾ E. FISCHER u. O. WARBURG, Ber. dtsh. chem. Ges. **38**, 3979 (1905).

¹²⁾ I. STÖCK, Diplomarbeit an der Math.-Nat.-Fak. Halle 1962.

¹³⁾ E. FISCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **39**, 2320 (1906).

¹⁴⁾ G. LOSSE, A. LOSSE u. I. STÖCK, Z. Naturforsch. Tübingen **17 b**, 785 (1962).

jeweils 1 g Palladiumkohle zugesetzt und bei Zimmertemperatur 4 Stunden [bei Ansatz d): 34 Stunden] hydriert. Das Verdünnen der Hydrierlösungen mit absol. Äther brachte keinen Aminosäureniederschlag. Nach Abziehen der Lösungsmittel resultierten saure, nicht kristalline Kondensationsprodukte.

4. Hydrierung der Formylaminosäure-methylester

a) in Eisessig

0,01 Mol Formylaminosäure-methylester, in 30 cm³ Eisessig gelöst und mit 1 g Palladiumkohle versetzt, wurde 3,5 Stunden bei Zimmertemperatur hydriert. Die durchschnittliche Wasserstoffaufnahme entsprach 175% d. Th. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhielt man 1,8–2,1 g eines nicht kristallinen, neutralen Kondensationsproduktes.

b) in THF

Die Hydrierung wurde analog in 50 cm³ absol. THF ausgeführt und nach 7 Stunden bei einer durchschnittlichen Wasserstoffaufnahme von 30% d. Th. abgebrochen. Beim Verdünnen der Hydrierlösung mit absol. ätherischem Chlorwasserstoff fiel in etwa 20% Ausbeute das Aminosäureester-hydrochlorid aus.

Glycinmethylester-hydrochlorid	Schmp. 175°
Alaninmethylester-hydrochlorid	Schmp. 157°
Valinmethylester-hydrochlorid	Schmp. 122°
Phenylalaninmethylester-hydrochlorid	Schmp. 158°

c) in THF/Chlorwasserstoff

Zur Hydrierung wurden 0,01 Mol Formylaminosäure-methylester, 50 cm³ absol. HCl-gesättigtes THF und 1 g Katalysator angewandt. Nach 5–7 Stunden wurden 246 cm³ (entspr. 100% d. Th. bei 23° und 755 Torr) Wasserstoff aufgenommen. Das teilweise abgeschiedene Ester-hydrochlorid wurde durch Verdünnen mit absol. Äther völlig ausgefällt und in Ausbeuten von durchschnittlich 90% rein isoliert.

d) in Methanol/Chlorwasserstoff

Ausgehend von 0,01 Mol Formylester und 60 cm³ absol. HCl-gesättigtem Methanol wurde unter sonst gleichen Bedingungen 30 Stunden hydriert. Nach dieser Zeit war 30% der theoretisch benötigten Menge Wasserstoff aufgenommen worden. Nach Verdünnen der Reaktionslösung mit absol. Äther resultierten die Ester-hydrochloride in durchschnittlich 88proz. Ausbeute.

5. Synthese von Dipeptid-alkylestern

a) Formyl-dipeptid-alkylester

CHO-DL-Phe-DL-Phe-OEt und CHO-DL-Val-DL-Phe-OMe

0,03 Mol CHO-DL-Phe (CHO-DL-Val) wurden mit 0,03 Mol Triäthylamin in 14 cm³ Dioxan gelöst und bei –5° mit 2,7 cm³ Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 15 Minuten Rühren bei –5° wurden 0,03 Mol DL-Phe-OEt · HCl (DL-Phe-OMe · HCl) und 0,03 Mol Triäthylamin hinzugesetzt und noch 15 Minuten bei 0° sowie weitere 15 Minuten

bei 20° gerührt. Nach Filtration, Einengen im Vakuum und Anreiben mit 30 cm³ Wasser wurde im Kühlschrank stehengelassen.

CHO-DL-Phe-DL-Phe-OEt Schmp. 170°
 C₂₁H₂₄O₄N₂ (368,4) ber.: C 68,40; H 6,53; N 7,61;
 gef.: C 68,28; H 6,68; N 7,97.

CHO-DL-Val-DL-Phe-OMe Schmp. 165–166°¹⁾
 C₁₆H₂₂O₄N₂ (306,4) ber.: C 62,55; H 7,20; N 9,13;
 gef.: C 62,08; H 7,26; N 9,31.

CHO-L-Leu-L-Val-OEt, CHO-L-Val-L-Phe-OMe und CHO-L-Pro-Gly-OEt

0,01 Mol Formyl-L-aminosäure, in 50 cm³ eines Gemisches aus gleichen Teilen Methylchlorid und Dioxan gelöst, wurden bei –20° mit 0,01 Mol L-Aminosäureester in 5 cm³ Methylchlorid und 0,01 Mol Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach einstündigem Rühren bei –20° und 3stündigem bei 20° wurde 8 Stunden stehengelassen, vom ausgeschiedenen Harnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel bei 35° Badtemperatur entfernt, der Rückstand in wenig Essigester aufgenommen und mit 5proz. HCl, 5proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mittels Na₂SO₄ fiel mit Petroläther der Formyl-dipeptidester aus.

CHO-L-Leu-L-Val-OEt farbl. Öl, n_D²⁰ = 2,623
 [α]_D²⁰ = –43,25° (c = 1,004 in absol. Alk.)

C₁₄H₂₆O₄N₂ (286,4) ber.: N 9,78;
 gef.: N 9,84.

CHO-L-Val-L-Phe-OMe Schmp. 148–149°¹⁾
 [α]_D²³ = –42,3° (c = 1,480 in absol. Meth.)

C₁₆H₂₂O₄N₂ (306,4) ber.: N 9,13;
 gef.: N 9,21.

CHO-L-Pro-Gly-OEt farbl. Öl n_D²⁰ = 2,220
 [α]_D²² = –46,47° (c = 2,260 in absol. Alk.)

C₁₀H₁₆O₄N₂ (228,3) ber.: C 52,90; H 7,03; N 12,28;
 gef.: C 52,10; H 7,11; N 12,02.

b) Hydrierende Abspaltung der N-Formylgruppe

0,01 Mol des Formyl-dipeptid-alkylesters wurde in 100 cm³ einer absol. 1n-Lösung von Chlorwasserstoff in THF gelöst und nach Zusatz von 2 g Palladiumkohle in der Schüttelente bei Zimmertemperatur hydriert. Nach 3–4 Stunden, maximal nach 7 Stunden, wurde die theoretische Menge Wasserstoff (246 cm³ bei 23° und 755 Torr) aufgenommen. Nach Abtrennen des Katalysators, Einengen der Lösung im Vakuum und Verdünnen mit viel absol. Äther fiel das Peptidester-hydrochlorid aus. Durchschnittliche Ausbeute: 90% d. Th. Die resultierenden Peptidester erwiesen sich als chromatographisch rein.

DL-Phe-DL-Phe-OEt Schmp. 220–226°
 C₂₀H₂₄O₃N₂ · HCl (376,9) ber.: C 63,70; H 6,68; N 7,45;
 gef.: C 63,46; H 6,60; N 7,57.

DL-Val-DL-Phe-OMe Schmp. 230–233°¹⁾
 C₁₅H₂₂O₃N₂ · HCl (314,8) ber.: N 8,90;
 gef.: N 8,89.

L-Leu-L-Val-OEt Schmp. 147–148°
 [α]_D²³ = +29,7° (c = 1,012 in absol. Alk.)

C₁₃H₂₆O₃N₂ · HCl (294,8) ber.: C 53,01; H 9,22; N 9,52;
 gef.: C 53,42; H 9,44; N 9,51.

L-Val-L-Phe-OMe	Schmp. 195—196° ¹⁾
	$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +25,2^{\circ}$ (c = 1,802 in Wasser)
$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$ (314,8)	ber.: N 8,90; gef.: N 9,18.
L-Pro-Gly-OEt	Schmp. 119—120° ¹⁵⁾
	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -40,3^{\circ}$ (c = 1,80 in Wasser)
$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$ (236,7)	ber.: N 11,85; gef.: N 11,96.

¹⁵⁾ H. N. RYDON u. P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. (London) 3642 (1956).

Halle (Saale), Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 5. Oktober 1963.