

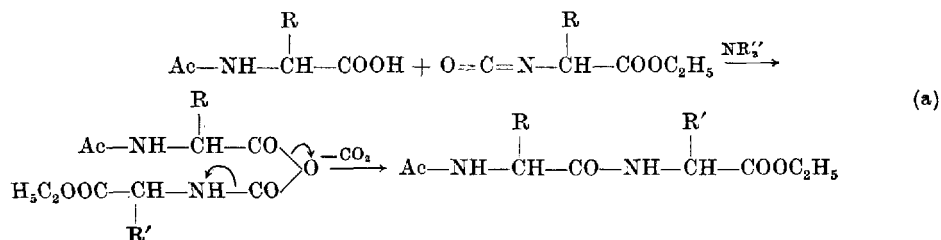
Peptidsynthesen unter Anwendung von N-Carbonyl-aminosäure-nitrobenzyl- und nitrophenylestern¹⁾

Von G. LOSSE und H. VIETMEYER

Inhaltsübersicht

Durch Umsetzung von Salzen der Aminosäure-p-nitrobenzyl- und -p-nitrophenylester mit Phosgen erhält man gut kristallisierende N-Carbonyl-aminosäureester, deren Verwendung bei Peptidsynthesen prinzipiell gezeigt wird.

Bei der Peptidsynthese nach GOLDSCHMIDT werden N-geschützte Aminosäuren mit N-carbonyl-aminosäure-alkylestern (α -Isocyano-fettsäure-alkylestern) in Gegenwart tertiärer Basen zu N-geschützten Peptid-alkylestern vereinigt²⁻⁵⁾.



Als Kupplungskomponenten dienten hierzu bisher ausschließlich die N-Carbonyl-aminosäure-äthylester, welche gewöhnlich ölig anfallen und destillativ gereinigt werden müssen^{2) 3) 6) 7)}. Die Darstellung von optisch reinen N-Car-

¹⁾ Verwendete Abkürzungen: Cbo = Carbobenzoxy; Phth = Phthaloyl; ONB = p-Nitrobenzyl; ONP = p-Nitrophenyl; OEt = Äthyl; COGly = N-Carbonylverbindung der betr. Aminosäure; DMF = Dimethylformamid.

²⁾ ST. GOLDSCHMIDT u. M. WICK, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 (1952).

³⁾ ST. GOLDSCHMIDT u. M. WICK, Z. Naturforsch. **5b**, 170 (1950).

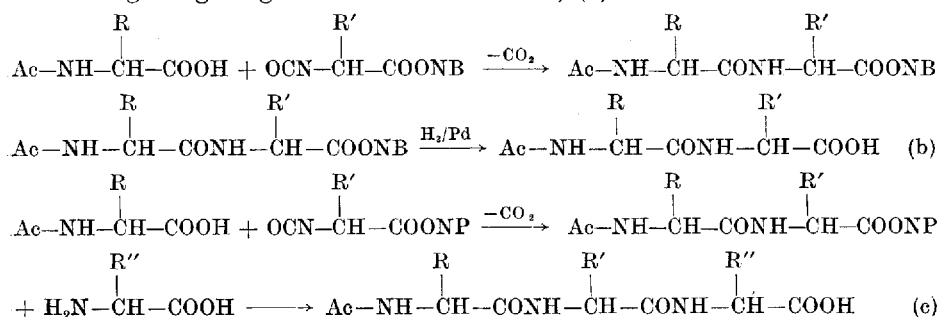
⁴⁾ A. FRY, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2686 (1953).

⁵⁾ W. J. HUMPHLETT u. C. V. WILSON, J. Org. Chem. **26**, 2507 (1961).

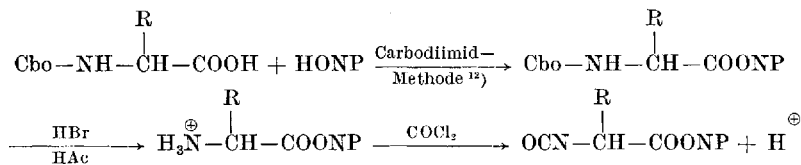
⁶⁾ K. SCHLÖGL, Mh. Chem. **89**, 61 (1958).

⁷⁾ A. SMITH u. C. C. UNRUH, J. Org. Chem. **22**, 442 (1957).

bonylestern, welche z. B. für das Studium von Racemisierungsfragen in der Peptidchemie benötigt werden, bereitet so jedoch Schwierigkeiten und findet bei den Verbindungen höheren Molekulargewichtes zudem ihre Grenze. Wir haben deshalb versucht, durch Variation der Estergruppe gut kristallisierende N-Carbonylamino-säure-Derivate zu gewinnen. Bestimmend für die Auswahl der Estergruppe war ferner, Kupplungskomponenten zu erhalten, die sich in der Peptidsynthese vielseitiger einsetzen lassen. Es interessierten daher besonders die N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrobenzyl- und -p-nitrophenylester, also Ester, deren Carboxylgruppe sich nach erfolgter Peptidverknüpfung unter alkalifreien Bedingungen leicht in Freiheit setzen läßt⁸⁾ (b), oder die carboxylseitig direkt mit einer weiteren Aminosäure unter Kettenverlängerung umgesetzt werden können⁹⁾ (c).



Zur Synthese der N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrobenzylester gingen wir von den Aminosäure-p-nitrobenzylester-tosylaten bzw. -benzolsulfonaten (Tab. 1 und 2) aus, welche durch direkte Veresterung der Aminosäuren mit p-Nitrobenzylalkohol in Tetrachlorkohlenstoff¹⁰⁾¹¹⁾ in Ausbeuten von 70 bis 80% zugänglich sind. Nach Überführung der Sulfonate in die Hydrochloride (Tab. 3) wurden letztere mittels Phosgen in trockenem Toluol in etwa 80% Ausbeute zu den N-Carbonyl-Verbindungen umgesetzt (Tab. 4). Die entsprechenden N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrophenylester wurden auf folgendem Wege erhalten:



⁸⁾ R. SCHWYZER u. P. SIEBER, *Helv. Chim. Acta* **42**, 972 (1959).

⁹⁾ M. BODANSZKY, *Nature (London)* **175**, 685 (1955).

¹⁰⁾ J. E. SHIELDS, W. H. MCGREGOR u. F. H. CARPENTER, *J. Org. Chem.* **26**, 1491 (1961).

¹¹⁾ J. E. SHIELDS u. F. H. CARPENTER, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 3066 (1961).

¹²⁾ H. G. KHORANA, *Chem. Rev.* **53**, 145 (1953).

Tabelle 1
 DL-Aminosäure-p-nitrobenzylester-tosylate

DL-Aminosäure	Schmp. °C	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse (oben ber./unten gef.)		
			C	H	N
Gly	207—208	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	50,23	4,74	7,32
		(382,4)	50,25	4,78	7,53
Ala	148—150	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₇ S	51,48	5,08	7,07
		(396,4)	51,43	4,92	7,36
Val	196—198	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	53,76	5,69	6,60
		(424,5)	53,95	5,51	6,77
Leu	191—193	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₇ S	54,78	5,97	6,38
		(435,5)	55,02	5,77	6,45
Phe	190—191	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	58,46	5,12	5,93
Ala—Gly	199—201	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	58,64	5,28	5,83
		C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₈ S	50,32	5,11	9,27
		(453,5)	50,19	5,08	9,27

 Tabelle 2
 Aminosäure-p-nitrobenzylester-benzolsulfonate

Aminosäure	Schmp. °C	[α] _D ²⁰ in DMF	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse (oben ber./unten gef.)		
				C	H	N
Gly	198—200		C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₇ S	49,00	4,36	7,61
			(364,4)	49,28	4,26	7,68
DL—Ala	165—166		C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	50,23	4,74	7,32
L—Ala	158—160	+7,3	(382,4)	50,48	4,88	7,07
DL—Val	169—171		C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₇ S	52,63	5,42	6,82
L—Val	157—159	+5,8	(410,5)	52,24	5,18	7,12
DL—Leu	203—205		C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	53,76	5,69	5,60
L—Leu	216—218	+5,5	(424,5)	53,63	5,62	6,63
DL—Phe	195—197		C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₇ S	57,63	4,83	6,11
L—Phe	190—191	+11,0	(458,5)	57,41	4,65	6,36
L—Glu*)	150—152	+6,9	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S	52,10	4,55	7,30
			(572,6)	51,99	4,57	7,20

*) L-Glutaminsäure-di-p-nitrobenzylester-benzolsulfonat.

Zur zusätzlichen optischen Reinheitskontrolle wurden die N-Carbonyl-L-aminosäureester mit 20proz. Salzsäure zu den L-Aminosäure-hydrochloriden verseift und diese mit authentischen Proben verglichen.

Die Verwendungsmöglichkeiten dieser neuen mono- bzw. diaktivierten Aminosäurederivate zur Peptidsynthese haben wir in den folgenden Synthesebeispielen geprüft. In Tab. 5 sind einige Dipeptidderivate aufgeführt, welche durch Verknüpfung von Cbo- oder Phthaloylamino-säuren mit den N-Carbonylamino-säure-p-nitrobenzylestern darstellbar sind.

Hierbei wurde in absolutem Toluol in Gegenwart von Pyridin als Katalysator bei 60–80 °C gearbeitet. Wurden die Ansätze dagegen in absolutem

Tabelle 3
Aminosäure-p-nitrobenzylester-hydrochloride

Aminosäure	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ in DMF	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse (oben ber./unten gef.)		
				C	H	N
Gly	197–199		$C_9H_{11}N_2O_4Cl$	43,82	4,49	11,36
			(246,7)	44,12	4,68	11,14
L-Ala	196–198	–2,45	$C_{10}H_{13}N_2O_4Cl$	46,08	5,04	10,75
			(260,7)	46,00	5,08	10,59
DL-Val	170–171		$C_{12}H_{17}N_2O_4Cl$	49,92	5,94	9,70
			(288,7)	49,68	6,26	9,75
L-Val	154–156	+7,2		49,67	6,09	9,97
L-Leu	145–147	+6,7	$C_{13}H_{19}N_2O_4Cl$	51,57	6,32	9,26
			(302,8)	51,29	6,49	9,00
L-Phe	209–211	+26,7	$C_{16}H_{17}N_2O_4Cl$	57,06	5,09	8,32
			(336,8)	57,18	4,92	8,22

Tabelle 4
N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrobenzylester und -p-nitrophenylester

N-Carbonyl- verbindung von	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ in Benzol	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse (oben ber./unten gef.)		
				C	H	N
Gly-ONB	91–92		$C_{10}H_9N_2O_5$	50,85	3,41	11,86
			(236,2)	50,92	3,63	11,96
L-Ala-ONB	89–90	–22,0	$C_{11}H_{10}N_2O_5$	52,80	4,03	11,20
			(250,2)	52,42	3,98	11,17
L-Val-ONB	50–51	–50,4	$C_{13}H_{14}N_2O_5$	56,11	5,07	10,07
			(278,3)	56,14	5,04	10,24
L-Leu-ONB	88–89	–29,2	$C_{14}H_{16}N_2O_5$	57,53	5,52	9,59
			(283,3)	57,71	5,58	9,79
L-Phe-ONB	66–67	–74,6	$C_{17}H_{14}N_2O_5$	62,57	4,38	8,59
			(326,6)	62,32	4,42	8,58
Gly-ONP	66–67		$C_9H_6N_2O_5$	48,66	2,72	12,61
			(222,2)	48,75	2,86	12,51
L-Ala-ONP	50–56	+8,3	$C_{10}H_8N_2O_5$	50,85	3,41	11,86
			(236,2)	50,60	3,40	12,18

Tabelle 5
Acyl-dipeptid-p-nitrobenzylester aus N-Carbonyl-aminosäure-
p-nitrobenzylestern

Acyl-dipeptid- p-nitrobenzylester	Ausbeute %	Schmelzpunkt °C	$[\alpha]_D^{20}$ in DMF
Cbo-Gly-Gly-ONB	81,5	109-110	—
Cbo-Gly-L-Ala-ONB	69,8	98-100	- 20,2
Cbo-Gly-L-Val-ONB	76,7	104-106	- 11,5
Cbo-Gly-L-Phe-ONB	67,2	180-181	+ 6,6
Phth-Gly-Gly-ONB	78	208-210	—
Phth-Gly-L-Ala-ONB	72,5	201-203	- 41,7
Phth-Gly-L-Val-ONB	73,6	201-202	- 43,9
Phth-Gly-L-Phe-ONB	64,8	204-206	- 16,1

Pyridin als Lösungsmittel ausgeführt²⁾, so fiel überwiegend der durch Disproportionierung des gemischten Carbonsäure-Carbaminsäure-anhydrides (a) gebildete Harnstoff an.

Bei Anwendung der diaktivierten N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrophenylester als Kupplungskomponenten lassen sich im Sinne von Formel (c) ohne Isolierung von Zwischenprodukten im „Eintopfverfahren“ Tripeptid-derivate aufbauen. Dazu wurde zunächst die Cbo-Aminosäure in wasserfreiem Toluol und in Gegenwart von 1 Äquivalent tertiärer Base mit dem N-Carbonylester zum Cbo-Dipeptidnitrophenylester umgesetzt und nach Beendigung der Reaktion dann durch Zugabe von absol. DMF als Lösungsvermittler und Aminosäureester-hydrochlorid die zweite Peptidbindung geknüpft. Einfache Cbo-Tripeptidester lassen sich so in 50—60proz. Ausbeute, bezogen auf N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrophenylester, gewinnen.

Beschreibung der Versuche

p-Nitrobenzylalkohol¹³⁾

Die Verbindung erhielten wir über Benzylacetat¹⁴⁾ und p-Nitrobenzylacetat¹⁵⁾.

Aminosäure-p-nitrobenzylester-hydrochloride (Tab. 3)

Die Aminosäure-p-nitrobenzylester-benzolsulfonate und -p-toluolsulfonate wurden nach J. E. SHIELDS, W. H. MCGREGOR und F. H. CARPENTER¹⁰⁾¹¹⁾ gewonnen. 0,01 Mol des Sulfonates, in 18 cm³ absolutem CHCl₃ gelöst und mit 0,01 Mol Triäthylamin versetzt, wurde dann mit absolutem Äther verdünnt und nach Absaugen des ausgefallenen Triäthylaminsulfonates langsam Chlorwasserstoff bis zur quantitativen Fällung des Hydrochlorides eingeleitet (Ausbeute 80%, bezogen auf Sulfonat). Reinigung aus Alkohol/Äther.

¹³⁾ W. KRAUSS u. H. OHLE, D.P. (DDR) 10292 vom 11. 1. 1952; Ref.: C 1956, 13850.

¹⁴⁾ S. CANNIZZARO, Liebigs Ann. Chem. 88, 130 (1853).

¹⁵⁾ F. BEILSTEIN u. A. KUHLEBERG, Liebigs Ann. Chem. 147, 340 (1868).

Aminosäure-p-nitrophenylester-hydrobromide

Cbo—Gly—ONP: Schmp. 127—128 °C.

Cbo—L—Ala—ONP: Schmp. 78—79 °C; $[\alpha]_D^{20} = -37,5$ (c = 1,3 in Essigester).

Die Aminosäureester-hydrobromide wurden hieraus durch 1/2ständiges Behandeln mit der 6fachen Menge von 36proz. HBr in Eisessig bei Zimmertemperatur erhalten.

Gly—ONP · HBr: Schmp. 212—213 °C¹⁶).

L—Ala—ONP · HBr: Schmp. 182—183 °C¹⁶); $[\alpha]_D^{20} = -2,2$ (c = 2,05 in Äthanol).

N-Carbonyl-aminosäureester (Tab. 4)

0,02—0,03 Mol 1 Stunde bei 100 °C und 1 Torr über P₂O₅ getrocknetes Aminosäure-p-nitrobenzylester-hydrochlorid bzw. Aminosäure-p-nitrophenylester-hydrobromid wurden in 80 cm³ absolutem, ketylgetrockneten Toluol suspendiert und bei Siedetemperatur unter Rühren ein kräftiger Phosgenstrom über die Suspension geleitet, bis eine klare Lösung entstanden war. Nach Vertreiben des Phosgenüberschusses aus der siedenden Lösung mittels trockenen Stickstoffes wurde das Toluol im Vakuum abdestilliert und die resultierenden rohen N-Carbonylester aus Tetrachlorkohlenstoff/Petroläther umkristallisiert.

Acyl-dipeptid-p-nitrobenzylester (Tab. 5)

0,01 Mol N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrobenzylester und 0,012 Mol N-Acylaminosäure (Cbo—Gly: Schmp. 121 °C; Phth—Gly: Schmp. 191—192 °C) wurden in einem Gemisch von 50 cm³ absolutem, ketylgetrockneten Toluol und 2 cm³ absolutem Pyridin auf 60 bis 80 °C erhitzt, bis die CO₂-Entwicklung beendet war. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und der Acyl-dipeptidester mit Petroläther gefällt. Zur Reinigung wurde aus 50proz. wäßrigen Äthanol umkristallisiert.

Acyl-dipeptide

2,5 mmol Phth-dipeptid-p-nitrobenzylester wurden in 50 cm³ absolutem Methanol unter Zugabe von 2 cm³ Eisessig an Pd-Mohr unter Schütteln hydriert, bis die berechnete Wasserstoffmenge verbraucht war. Nach Abtrennung des Katalysators und Lösungsmittels wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit NaHCO₃-Lösung extrahiert und der Extrakt mit verdünnter HCl angesäuert. Das Umkristallisieren erfolgte aus Essigester/Petroläther.

Phth—Gly—Gly—OH: Schmp. 228—229 °C¹⁷).

Phth—Gly—L—Val—OH: Schmp. 202—204 °C¹⁷); $[\alpha]_D^{20} = -5,8$
(c = 1,0 in Äthanol).

Phth—Gly—L—Phe—OH: Schmp. 194—195 °C¹⁷); $[\alpha]_D^{20} = +56,4$
(c = 1,2 in Äthanol).

Umsetzung von Cbo-Glycin mit N-Carbonyl-L-valin-p-nitrobenzylester in Pyridin

0,1 Mol N-Carbonyl-L-valin-p-nitrobenzylester und 0,12 Mol Cbo-Glycin wurden in 20 cm³ absolutem Pyridin 30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und dann 1 Stunde

¹⁶) M. GOODMAN u. K. C. STUEBEN, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

¹⁷) F. WEYGAND u. J. KAELICKE, Chem. Ber. **95**, 1031 (1962).

auf 60 °C erwärmt. Nach üblicher Aufarbeitung wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in Essigester bzw. Alkohol zwei Produkte isoliert.

Cbo—Gly—L—Val—ONB: Ausbeute 18% d.Th.; Schmp. 104—106 °C; $[\alpha]_D^{20} = -11,5$ ($c = 1,85$ in DMF).

$C_{22}H_{21}N_3O_7$ (439,4) ber.: C 59,58; H 5,68; N 9,48;
gef.: C 59,60; H 5,85; N 9,36.

Harnstoffderivat $OC \begin{cases} \text{Val—ONB} \\ \text{Val—ONB} \end{cases}$ Ausbeute 40% d.Th.; Schmp. 176 °C; $[\alpha]_D^{20} = -18,7$ ($c = 1,85$ in DMF).

Die Verbindung war identisch mit einer Probe des nach Vorschrift von W. J. HUMPHRETT und C. V. WILSON¹⁸⁾ direkt aus N-Carbonyl-L-valin-p-nitrobenzylester gewonnenen Harnstoffderivates.

Beispiel für die Synthese von Acyl-tripeptidestern durch zweiseitige Peptidknüpfung an N-Carbonyl-aminosäure-p-nitrophenylestern

0,01 Mol N-Carbonyl-glycin-p-nitrophenylester und 0,012 Mol Cbo-Glycin wurden in einem Gemisch von 50 cm³ absolutem Toluol und 2 cm³ Pyridin auf 60—80 °C erhitzt, bis die CO₂-Entwicklung beendet war. Dann wurde die Hälfte des Toluols im Vakuum entfernt und durch absolutes DMF ersetzt, sowie 0,02 mol Glycinäthylester-hydrochlorid und 0,02 mol Pyridin hinzugefügt. Nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur und üblicher Aufarbeitung wurde in 54% Ausbeute (bez. auf das eingesetzte Isocyanat) Cbo—Gly—Gly—Gly—OEt isoliert. Die Reinigung erfolgte aus Äthanol/Wasser. Schmp. 165—166 °C¹⁸⁾.

$C_{16}H_{21}N_3O_8$ (351,3) ber.: C 54,69; H 6,02; N 11,96;
gef.: C 54,92; H 5,81; N 11,80.

¹⁸⁾ W. LAUTSCH u. H. KÄRGE, Chem. Ber. **89**, 737 (1956).

Dresden, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität und

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

Bei der Redaktion eingegangen am 2. April 1965.