

LEICHT ABSPALTBARE SCHUTZGRUPPEN FÜR SÄUREAMIDFUNKTIONEN

1. Mitteilung

Friedrich Weygand, Wolfgang Steglich, Jonas Bjarnason,
Roshan Akhtar und Nur Muhammad Khan

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München

(Received 20. May 1966)

Während für den reversiblen Schutz der Amino-, Hydroxy-, Thiol- und Carboxyl-funktionen bei Peptidsynthesen zahlreiche Methoden bekannt sind, ist dies für die Säureamidfunktion nicht der Fall. Eine Schutzgruppe für die Säureamidfunktion sollte die bekannten Nebenreaktionen, wie Imidbildung und Dehydratisierung zu Nitrilen¹ verhindern, leicht einführbar sein und sich unter milden Bedingungen wieder abspalten lassen. Durch Ersatz der H-Atome der Säureamidgruppen sollte die Ausbildung von Wasserstoffbrücken unmöglich gemacht und die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln erhöht werden. Über die geringe Löslichkeit von asparagin- und glutamin-haltigen Zwischenprodukten bei Peptidsynthesen ist wiederholt berichtet worden.

Allen diesen Anforderungen genügt der 2.4-Dimethoxy-benzyl-Rest (DMB-Rest). So liefert z.B. Benzoesäure-2.4-dimethoxy-benzylamid oder Benzoesäure-bis-(2.4-dimethoxy-benzyl)-amid mit Trifluoressigsäure beim Erwärmen (45 Min.) glatt Benzamid. Unter denselben Reaktionsbedingungen ist die Abspaltung des p-Methoxy-benzyl-Restes aus Benzoesäure-p-methoxy-benzylamid noch unvollkommen und Benzoesäure-benzylamid bleibt unverändert.

An N-geschützten Glycin-peptiden wurde zunächst die Abspaltung des DMB-Restes von der Peptidbindung im Vergleich zum Z-Rest und pMZ-Rest einerseits und dem p-Methoxy-benzyl- (pMB)-Rest und Benzyl-(Bzl)-Rest andererseits untersucht.

Verbindung	Abspaltungsbedingungen und Produkte
<u>Trifluoressigsäure + Anisol^{a)}</u>	
Z-Gly-(DMB)Gly-OH	B (20 Stdn.) : Gly-Gly, Spuren Z-Gly-Gly-OH C (1 Std.) : Gly-Gly
pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH	A (10 Min.) : Gly-(DMB)Gly (69 %), b) B (12 Stdn.) : Gly-Gly, Spuren Gly-(DMB)Gly C (30 Min.) : Gly-Gly
pMZ-Gly-(pMB)Gly-OH	A (10 Min.) : Gly-(pMB)Gly (74 %), b) B (10 Min.) : Gly-(pMB)Gly, b) C (2 Stdn.) : Gly-Gly, Spuren Gly-(pMB)Gly
Z-Gly-(Bzl)Gly-OH	C (30 Min.) : Gly-(Bzl)Gly, b) C (60 Min.) : Gly-(Bzl)Gly, wenig Gly-Gly
pMZ-Gly-(Bzl)Gly-OH	A (10 Min.) : Gly-(Bzl)Gly, b) C (2 Stdn.) : Gly-(Bzl)Gly, b)
<u>Ameisensäure (99.5-proz.) + Anisol^{a)}</u>	
Z-Gly-(DMB)Gly-OH	C (20 Min.) : Z-Gly-Gly-OH (79 %), b)
pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH	A (30 Min.) : pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH, wenig Gly-(DMB)Gly B (12 Stdn.) : Gly-(DMB)Gly, b) C (2 Min.) : Gly-(DMB)Gly (70 %), b) C (15 Min.) : Gly-Gly, wenig Gly-(DMB)Gly
pMZ-Gly-(pMB)Gly-OH	C (15 Min.) : Gly-(pMB)Gly, b)
pMZ-Gly-(Bzl)Gly-OH	C (15 Min.) : Gly-(Bzl)Gly, b)
<u>HBr/Eisessig (45 Min. bei 20°)</u>	
pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH	Gly-Gly, Spuren Gly-(DMB)Gly
pMZ-Gly-(pMB)Gly-OH	Gly-Gly, wenig Gly-(pMB)Gly
Z-Gly-(Bzl)Gly-OH	Gly-(Bzl)Gly, b)

a) A: bei 0°; B: bei 20°; C: siedend.

b) Einziger Fleck im Dünnschichtchromatogramm, Kieselgel G nach Stahl, n-Butanol-Essigsäure-Wasser, 4:1:1 vol., Sichtbarmachung mit Ninhydrin, konz. Schwefelsäure und Jod.

Katalytische Hydrierung^{c)}

Z-Gly-(DMB)Gly-OH	Gly-(DMB)Gly (71 %), b)
pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH	Gly-(DMB)Gly (93 %), b)
pMZ-Gly-(pMB)Gly-OH	Gly-(pMB)Gly, b)
Z-Gly-(Bzl)Gly-OH	Gly-(Bzl)Gly, b)

Natrium in flüssigem Ammoniak^{d)}

Z-Gly-(DMB)Gly-OH	D: Gly-Gly, Gly-(DMB)Gly (etwa 1:1) E: Gly-Gly (91 %)
pMZ-Gly-(DMB)Gly-OH	D: Gly-Gly, Spuren Gly-(DMB)Gly
pMZ-Gly-(pMB)Gly-OH	D: Gly-Gly, wenig Gly-(pMB)Gly
Z-Gly-(Bzl)Gly-OH	D: Gly-Gly, wenig Gly-(Bzl)Gly

c) Pd-Kohle, 1 ml 0.5n abs. methanolische HCl für 100 mg Substanz.

d) D: Unter Aceton/Trockeneis-Kühlung, 20 Min.

E: Wie bei D, anschließend 20 Min. ohne Kühlung.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß der DMB-Rest die besten Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Schutzgruppen bietet.

1) Er kann durch Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur oder durch siedende Ameisensäure abgespalten werden, ohne daß der Z-Rest angegriffen wird. Umgekehrt bleibt die DMB-Gruppe erhalten, wenn der Z-Rest durch katalytische Reduktion entfernt wird.

2) Der pMZ-Rest kann sowohl durch katalytische Reduktion als auch durch Trifluoressigsäure in der Kälte oder durch kurzes Erhitzen in Ameisensäure ohne Angriff auf den DMB-Rest abgespalten werden.

3) Natrium in flüssigem Ammoniak bietet keine Differenzierung zwischen dem DMB-Rest und Z-Schutzgruppen.

Der p-Methoxy-benzyl-rest wird von siedender Trifluoressigsäure wesentlich langsamer abgespalten, er ist daher zum reversiblen Schutz der Peptidbindung weniger geeignet. Noch ungünstiger ist der Benzyl-rest, der nur mit Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt werden kann.

Die Resultate lassen eine Abhängigkeit der sauren Abspaltbarkeit der Benzylgruppen von Säureamiden von der Zahl der im Phenylrest enthaltenen Methoxygruppen erkennen. Während beim Benzylloxycarbonyl-rest die Einführung einer p-Methoxygruppe die Abspaltbarkeit durch

kalte Trifluoressigsäure ermöglicht², müssen zur Abspaltung eines Benzylrestes von einer Säureamidbindung ("Benzylaminocarbonyl") durch kalte Trifluoressigsäure mindestens zwei Methoxygruppen vorhanden sein. Es besteht daher die Möglichkeit, die Abspaltbarkeit durch Einführung weiterer elektronenliefernder Gruppen noch zu steigern.

Die Abspaltung des DMB-Restes wurde noch an weiteren Beispielen untersucht. Z-Gly-(DMB)Gly-Gly-OH lieferte in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur (12 Stdn.) 76 % Gly-Gly-Gly und 24 % Z-Gly-Gly-Gly-OH, siedende Trifluoressigsäure spaltete Z-Gly-L-(DMB)Leu-OH bzw. Z-Gly-L-(DMB)Phe-OH (45 Min.) in guten Ausbeuten zu optisch reinem Gly-L-Leu bzw. Gly-L-Phe. Durch Einwirkung von Trifluoressigsäure auf Z-Gly-L-(DMB)Phe-OH (20°, 2 1/2 Stdn.) wurde der DMB-Rest selektiv entfernt.

Die an der Peptidbindung durch den DMB-Rest geschützten Peptid-derivate zeigen eine viel bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln als die nicht geschützten Verbindungen, z.B. löst sich pMZ-Gly-(DMB)Gly-(DMB)Gly-(DMB)Gly-(DMB)Gly-OH (Schmp. 114-118°) sehr gut in Essigester.

Die benötigten DMB-Aminosäuren wurden nach der Methode von Vogler u. Mitarb.³ aus den Benzyliden-Verbindungen durch Reduktion mit NaBH₄ hergestellt. In den DMB-Aminosäuren ist der DMB-Rest gegen Säure stabil, so daß die Ester mit Alkohol/HCl auf übliche Weise zugänglich sind. Die DMB-haltigen Peptide wurden mit Dicyclohexylcarbodiimid⁴ oder mit Methyl-äthynyl-dimethylamin⁵ hergestellt. Ob ein Ersatz des Wasserstoffatoms der carboxylendständigen Peptidbindung eines N-Acyl-peptids durch den DMB-Rest die Racemisierung verhindert, kann nach den Angaben der Literatur⁶ nicht vorausgesehen werden.

Von besonders großer praktischer Bedeutung ist die reversible Blockierung von primären Säureamiden. So kann z.B. aus Z-Gly-NH-DMB der DMB-Rest mit kalter Trifluoressigsäure entfernt werden, beim Erhitzen werden beide Schutzgruppen abgespalten. Die Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak liefert Gly-NH-DMB. Durch Verknüpfung mit Z-Aminosäuren und Reduktion der Zwischenprodukte mit Natrium in flüssigem Ammoniak wurde Z-L-Pro-L-Leu-Gly-NH-DMB gewonnen.

Zum vollständigen Schutz der Säureamidfunktion des Glutamins und Asparagins haben wir die Bis-DMB-Derivate eingesetzt. Durch Umsetzung von pMZ-L-Glutaminsäure- α -benzylester mit Bis-(2.4-dimethoxybenzyl)-amin⁷ nach der Inamin-Methode wurde pMZ-L-Glutaminsäure- α -benzylester- γ -bis-DMB-amid (Schmp. 98-99°, $[\alpha]_{546}^{24}$: -12.1° (c = 5 in Benzol), Ausb. 72 %) dargestellt, das nach Verseifung der Estergruppe in üblicher Weise zu Peptidsynthesen verwendet werden kann. Z.B. wurde pMZ-L-Glu(γ -N(DMB)₂)-L-Val-OCH₃ und daraus durch Verseifung pMZ-L-Glu(γ -N(DMB)₂)-L-Val-OH (Schmp. 67-70°, $[\alpha]_{546}^{25}$: -4.4° (c = 2 in Methanol, Ausb. 86 % für beide Stufen) erhalten. Aus dem analog dargestellten Z-L-Asparaginsäure- α -benzylester- β -bis-DMB-amid wurden nach Behandeln mit Trifluoressigsäure bei 20° (3 Stdn.) 40 % Z-L-Asparagin und mit siedender Trifluoressigsäure (45 Min.) 86 % L-Asparagin gewonnen.

Über die Synthese von längerkettigen Peptiden mit Amid-geschützten Zwischenprodukten wird demnächst berichtet.

Alle Verbindungen ergaben stimmende C,H,N-Analysen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für ein Stipendium an R. Akhtar.

-
- ¹ Vergl. z.B. E.Schröder u. K.Lübke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press, New York und London 1965.
- ² L.A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. **79**, 98 (1957); P.Weyand, K.Hunger, Chem. Ber. **95**, 1 (1962).
- ³ P.Quitt, J.Hellerbach u. K.Vogler, Helv. chim. Acta **46**, 327 (1963).
- ⁴ J.C.Sheehan u. P.G. Hess, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).
- ⁵ R.Buyle u. H.G. Viehe, Angew. Chem. **76**, 572 (1964).
- ⁶ H.Bovarnick u. H.T. Clarke, J. Amer. chem. Soc. **60**, 2426 (1938); M.Goodman u. K.C. Stueben, J. Org. Chem. **27**, 3409 (1962).
- ⁷ Bis-DMB-amin wurde durch Reduktion von 2.4-Dimethoxy-benzoesäure-2.4-dimethoxy-benzylamid mit LiAlH₄ in THF hergestellt. Zur Reinigung diente das Pikrolonat, Schmp. 150° (aus Alkohol).