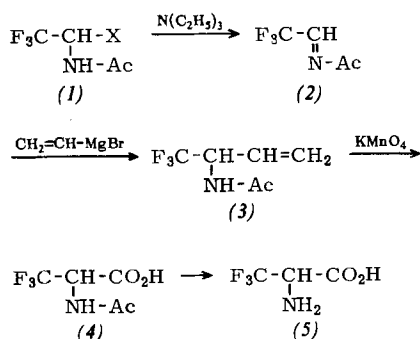


Synthese von 3,3,3-Trifluoralanin und 3,3,3-Trifluoralanylpeptiden [1]

Von Prof. Dr. F. Weygand, Doz. Dr. W. Steglich, Dipl.-Chem. W. Oettmeier, Dipl.-Chem. A. Maierhofer und Dipl.-Chem. R. S. Loy

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München

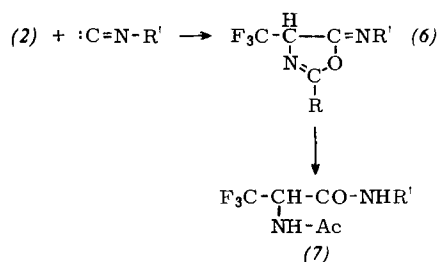
Aus N-Acyl-1-äthansulfonyl-2,2,2-trifluoräthylaminen (1), X: $-\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ [2] oder N-Acyl-1-halogen-2,2,2-trifluoräthylaminen (1), X: Cl, Br [1] lassen sich die N-Acyl-trifluoracetaldimine (2) [1] und daraus mit Vinylmagnesiumbromid die N-Acyl-1-trifluormethylprop-2-enylamine (3) darstellen. Deren Oxidation mit Kaliumpermanganat in Aceton/Wasser (1:3 v/v) unter Zusatz von wenig 3 N H_2SO_4 liefert N-Acyl-3,3,3-trifluoralanine (4) in hohen Ausbeuten (Ac: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$, Ausb. 92 %, Fp = 152 °C [2]; Ac: $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$, Ausb. 75 %, Fp = 112 °C).



Die N-Benzoylverbindung (4) ergibt beim Erhitzen mit konz. Salzsäure 3,3,3-Trifluoralanin-hydrochlorid, das in Chloroform durch Zusatz von Triäthylamin gelöst und mit Eisessig in das freie Trifluoralanin (5) (Ausb. 75 %; subl. oberhalb 210 °C) übergeführt wurde. Die Verbindung (5) hat deutlich saure Eigenschaften ($\text{pK}_1^* = 2,32$; $\text{pK}_2^* = 5,61$ [3]), liefert im Gegensatz zu unsubstituierten α -Monoamino-monocarbonsäuren ein kristallines Dicyclohexylammoniumsalz (Fp = 152 °C) und geht bei der Behandlung mit ätherischem Diazomethan in Lösung.

N-Benzoxycarbonyl-3,3,3-trifluoralanin kann in normaler Weise zur Herstellung von N-Benzoxycarbonyl-trifluoralanyl-peptidestern eingesetzt werden (z. B. Cbo-3,3,3-Trifluoralanyl-L-phenylalanin-methylester, Fp = 158 °C, Ausb. 74 %, mit Methyl-äthynyl-diäthylamin als Kondensationsmittel [4]). Nach dem beschriebenen Verfahren können allgemein α -Aminosäuren hergestellt werden, die eine perfluoralkylierte Seitenkette tragen. Auch N-Benzoyl-3,3,3-trichloralanin wurde analog gewonnen (Fp = 163 °C).

Eine weitere verallgemeinerungsfähige Synthese von Derivaten des 3,3,3-Trifluoralanins ist die Umsetzung von (2) mit Isonitrilen. Die primär entstehenden Addukte (6) [5], die nicht isoliert werden, gehen beim Behandeln mit verd. Säuren in N-Acyl-3,3,3-trifluoralanin-amide (7) über (z. B. N-Benzoxycarbonyl-3,3,3-trifluoralanin-cyclohexylamid, Ausb. 80 %, identisch mit der aus N-Benzoxycarbonyl-3,3,3-trifluoralanin hergestellten Verbindung).



Auf diese Weise lassen sich direkt Trifluoralanyl-Peptide gewinnen, wenn die aus N-Formylaminosäureestern leicht zugänglichen Isonitrile [6] eingesetzt werden. N-Benzoxycarbonyl-3,3,3-trifluoralanyl-L-leucin-methylester (Fp = 165 °C) wurde mit 64 % Ausbeute erhalten. Durch Überführung in den N-Trifluoracetylpeptid-methylester und gaschromatographische Diastereoisomeren-Trennung [7] ließ sich zeigen, daß bei der Synthese eine asymmetrische Induktion stattfindet (72:28).

Eine Erweiterung dieser Umsetzungen bringt die Verwendung von N-(N-Benzoxycarbonyl-aminoacyl)-1-chlor-2,2,2-trifluoräthylaminen (1), X: Cl; Ac: $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$, die aus N-Benzoxycarbonyl-aminosäureamiden durch Umsetzung mit Trifluoracetaldehyd und anschließende Behandlung mit PCl_5 zugänglich sind. Auf diese Weise erhält man N-Benzoxycarbonyl-tripeptidester mit mittelständigem Trifluoralanin, z. B. N-Benzoxycarbonyl-glycyl-3,3,3-trifluoralanyl-L-leucin-methylester (ölig), dessen Sequenz nach der Überführung in die N-Trifluoracetyl-Verbindung massenspektrometrisch [8] bestätigt wurde.

Eingegangen am 25. April 1966 [Z 228]

[1] IV. Mitteilung über N-Acyl-trihalogenacetalimine als reaktionsfähige Zwischenstufen bei Eliminierungs-Additionsreaktionen. — III. Mitteilung: F. Weygand, W. Steglich, I. Lengyel, F. Fraunberger, A. Maierhofer u. W. Oettmeier, Chem. Ber., im Druck. — Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Herrn Dr. O. Scherer, Farbwerke Hoechst A.-G., für die Überlassung von Trifluoracetaldehyd und Herrn Dr. A. Prox für die Aufnahme von Massenspektren.

[2] F. Weygand u. W. Steglich, Chem. Ber. 98, 487 (1965).

[3] Nach E. J. Cohn u. J. T. Edsall: Proteins, Amino Acids and Peptides. Reinhold, New York 1943, S. 83, hat Alanin $\text{pK}_1^* = 2,34$ und $\text{pK}_2^* = 9,69$ bei 25 °C.

[4] R. Buyle u. H. G. Viehe, Angew. Chem. 76, 572 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 582 (1964).

[5] Die Bildung von Oxazolin-Derivaten aus N-Benzoyl-hexafluoracetamin und Isonitrilen wurde von N. P. Gambarjan et al. beschrieben: Habilitationsschrift, Moskau 1965. — Zur Hydrolyse siehe E. M. Rochlin, Vortrag beim 3. Internat. Fluorsymposium, München 1965.

[6] I. Ugi, W. Betz, U. Fetzer u. K. Offermann, Chem. Ber. 94, 2814 (1961); F. Sakiyama u. B. Witkop, J. org. Chemistry 30, 1905 (1965).

[7] F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer u. W. König, Angew. Chem. 75, 282 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 183 (1963).

[8] F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel u. K. K. Sun, Z. Naturforsch. 20b, 1169 (1965).

Oligonucleotid-Synthese an einem löslichen Polymeren als Träger

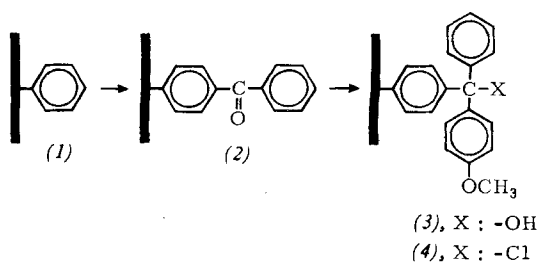
Von Prof. Dr. F. Cramer, Dipl.-Chem. R. Helbig, Dr. H. Hettler, Dr. K. H. Scheit und Dipl.-Chem. H. Seliger

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Chemische Abteilung, Göttingen

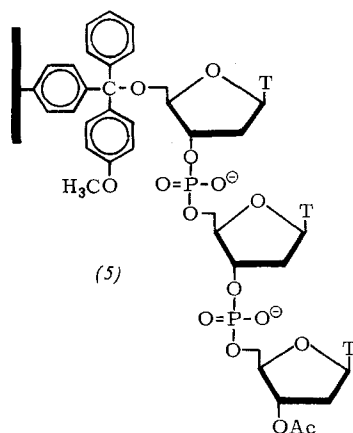
Die schrittweise Synthese von Oligonucleotiden erfordert nach jedem Schritt langwierige und verlustreiche Aufarbeitungen durch Säulentrennungen im wässrigen Medium.

Wir haben versucht, in Anlehnung an die Methode von Merrifield [1] Oligonucleotide an einem polymeren Träger aufzubauen [2], wobei sich die Verwendung eines in Pyridin löslichen Polystyrolderivates [3] als zweckmäßig erwies. Um eine für alle vier Nucleoside brauchbare Anheftung am Polymeren zu erreichen, verwendeten wir ein Polystyrol mit dem p-Methoxyphenyl-phenylmethylchlorid-Rest als funktioneller Gruppe. Polystyrol (1) (Mol.-Gew. 170000) wurde mit Benzoylchlorid/ AlCl_3 zum polymeren Keton (2) und dieses mit p-Methoxyphenyl-magnesiumbromid umgesetzt. Mit Acetylchlorid wurde das tert.-Carbinol (3) in das Chlorid (4) übergeführt.

Etwa 20 % der im Polystyrol enthaltenen Phenylreste ließen sich so in funktionelle Gruppen umwandeln. Das Polymere (4)



wurde in Pyridin mit 3'-O-Acetylthymidin umgesetzt, wobei 40 % der funktionellen Gruppen reagierten. Anschließend wurde die Acetylgruppe mit 0,01 M Na-methylat oder Ammoniak in Dioxan entfernt und der polymere Rückstand mit 3'-O-Acetyl-5'-thymidylsäure behandelt. Wiederholung des Vorganges ergab ein mit einem Trinucleotid beladenes Polymeres (5). Das Polymere kann nach jedem Reaktionsschritt mit apolaren Lösungsmitteln oder mit Wasser gefällt und durch Auswaschen oder Umfällen von Reagentien und nicht umgesetzten Ausgangsmaterialien befreit werden.



Nach der letzten Reaktion wurde das Nucleotid-Gemisch mit 1 ml 50-proz. Trifluoressigsäure in 100 ml Dioxan (1 Std. bei Raumtemperatur) abgespalten. Die Produkte wurden chromatographisch getrennt und analysiert. Dabei wurden Thymidin und die Nucleotide pT, TpT und TpTpT im Mol-verhältnis 28:7:25:40 erhalten. Die Ausbeute an TpTpT, bezogen auf Thymidin, betrug 11 %.

Unvernetzte Aminopolystyrole lassen sich mit Nucleotiden unter Bildung der (säurelabilen) Phosphorsäureamid-Bindung beladen. Es wurde ein Polymeres verwendet, welches durchschnittlich an jeder vierten Styroleinheit eine aromatische Aminogruppe enthält. 9 % der Aminogruppen setzten sich mit 5'-Thymidylsäure um (Kondensationsmittel: Dicyclohexylcarbodiimid). Die Abspaltung vom polymeren Träger gelingt mit 80-proz. Essigsäure bei 80 °C (24 Std.).

Eingegangen am 9. Mai 1966 [Z 233]

[1] R. B. Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85, 2149 (1963); 86, 304 (1964).

[2] Vgl. R. L. Letsinger u. V. Mahadevan, J. Amer. chem. Soc. 87, 3526 (1965).

[3] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. I. V. Kozhevnikova, Tetrahedron Letters 1965, 2323.

Ein Chymotrypsin-Modell

Von Prof. Dr. F. Cramer und Dipl.-Chem. G. Mackensen

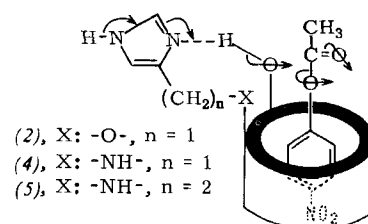
Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin,
Chemische Abteilung, Göttingen

Die Chymotrypsin-Katalyse beruht auf einer Säure-Base-Katalyse des Imidazols, wobei im Enzymprotein eine Imidazolgruppe des Histidins die Nucleophilie einer Serin-Hydroxygruppe so stark erhöht, daß bei pH = 7 bis 8 eine

Umesterung mit anschließender Spaltung der Enzym-Produkt-Zwischenverbindung stattfindet [1]. Das Substrat muß dabei im ersten Schritt der Reaktion durch eine sehr spezifische, nicht-covalente Bindung am Enzym gebunden und in die richtige Position zu den katalytisch wirkenden Gruppen gebracht werden; die Bindung in Einschlußverbindungen [2] gleicht in vieler Hinsicht dieser „Schlüssel-Schloß“-Beziehung zwischen Enzym und Substrat [3].

Cyclodextrine katalysieren spezifisch die Spaltung substituierter Pyrophosphate [4] und substituierter Phenylacetate [5]; in beiden Fällen entsteht eine Acyl-Katalysator-Zwischenverbindung. Die katalytisch wirksamen Gruppen sind die Hydroxygruppen im Cyclodextrin.

Wir haben nun als zusätzliche katalytisch wirksame Gruppe den Imidazol-Rest an β -Cyclodextrin (1) angefügt. (1) wurde mit 4(5)-Chlormethylimidazol in Gegenwart von Base als Hydroxymethylimidazol zu (2) veräthert, wobei Produkte mit durchschnittlich zwei Imidazol-Substituenten an einem Molekül (1) entstanden. Eine andere Möglichkeit ist die Umsetzung von Hepta-(6-O-tosyl)- β -cyclodextrin (3) mit 4(5)-Aminomethylimidazol oder Histamin zu (4) bzw. (5). Schließlich wurde (3) mit Imidazol behandelt, wobei Derivate (6) entstehen, in denen der Stickstoff des Imidazols in (1) an der 6-Stellung der Monosaccharideinheit gebunden ist.



Wir ermittelten die katalytische Wirkung der substituierten Cyclodextrine aus der Geschwindigkeit der Verseifung von p-Nitrophenylacetat ($0,3 \times 10^{-4}$ M) durch spektrophotometrische Messung bei 400 nm vom Beginn der Zugabe des Katalysators an. (Reaktionsbedingungen: 23 °C; $0,3 \cdot 10^{-2}$ M (1), oder $0,3 \cdot 10^{-2}$ M freies oder gebundenes Imidazol in einem Gemisch aus 0,02 M Trispuffer (pH = 7,5) und Dioxan 98:2 (v/v)). Die Tabelle zeigt unsere Ergebnisse.

Katalysator	Imidazolgruppen pro Molekül (1)	k · 10 ⁴ [sec ⁻¹]
ohne (pH = 7,5)		0,21
α -Dextrin		0,32
β -Dextrin (1)		0,59
Imidazol		15
(1) + Imidazol		17
4(5)-Hydroxymethylimidazol		3,3
(2)	2	41
4(5)-Aminomethylimidazol		2,1
(4)	3	3,6
Histamin		4,0
(5)	3	6,1
(5)	4	13,0
N-Methylimidazol		8,8
(6)	2	12

Eingegangen am 11. Mai 1966 [Z 231]

[1] Vgl. z. B. B. Hartley in: Structure and Activity of Enzymes. Academic Press, New York 1964, S. 47.

[2] F. Cramer: Einschlußverbindungen. Springer-Verlag, Heidelberg 1954.

[3] F. Cramer u. W. Kampe, J. Amer. chem. Soc. 87, 1115 (1965).

[4] N. Hennrich u. F. Cramer, J. Amer. chem. Soc. 87, 1121 (1965).

[5] W. Kampe, Dissertation, Universität Heidelberg 1961; vgl. M. Bender, R. L. van Etten, G. A. Clowes u. J. F. Sebastian, J. Amer. chem. Soc. 88, 2318 (1966), M. Bender, R. L. van Etten u. G. A. Clowes, ibid. 88, 2319 (1966).