

HARTMUT NIEDRICH

Hydrazinosäuren als Heterobestandteile in Peptiden, III¹⁾

N^α-Tosyl-N^β-aminoacyl-hydrazinoessigsäure-Derivate²⁾

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Berlin-Buch

(Eingegangen am 23. April 1963)

*N^α-Cbo-Aminoacyl-hydrazinoessigsäureester und -amide werden am freien α-Stickstoff durch die Tosylgruppe geschützt und lassen sich dann wie Peptid-Derivate zur Synthese höherer Heteropeptide einsetzen. Die der carboxylenständigen Oxytocinsequenz analogen bzw. homologen *N^α*-geschützten Aminoacyl-hydrazinoacetamide werden synthetisiert.*

In der II. Mitteilung dieser Reihe¹⁾ war gezeigt worden, daß der freie α-Stickstoff von *N^β-Acyl-hydrazinoessigsäure-Derivaten* durch Cbo-Chlorid mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) leicht zu acylieren ist. Lediglich *p*-Nitro-phenylester von Cbo-Aminosäuren ermöglichen eine Acylierung der Aminogruppe von *N^β-Aminoacyl-hydrazinoessigestern* ohne Nebenreaktion am α-Stickstoff³⁾. Für die Verknüpfung von geschützten Peptidbausteinen kommt man jedoch ohne die CURTIUS-sche Azidmethode und die SHEEHANSche Carbodiimidmethode⁴⁾ nicht aus. Der freie α-Stickstoff von Hydrazinopeptid-Derivaten führt infolge seiner nucleophilen Eigenschaften bei den meisten Peptidknüpfungsverfahren und bei Verseifungen zu unliebsamen Nebenreaktionen^{1,3)}. Es erwies sich als notwendig, eine *N^α*-Schutzgruppe einzuführen, die während der Peptidsynthese unangetastet bleibt und am Ende nach einem besonderen Verfahren abgespalten wird, ähnlich wie es für die ε-NH₂-Gruppe des Lysins praktiziert wurde⁵⁾. Dabei waren die geringe Basizität (*pK_b* = 11) und die ausgeprägte Nucleophilie des α-Stickstoffs zu berücksichtigen. Der bei Peptidsynthesen oft verwendete Tosylrest⁵⁾ erwies sich hierfür als geeignet.

In wäßriger Phase bei pH 8 ließen sich Ester und Amide der Cbo-Aminoacyl-hydrazinoessigsäure infolge ihrer geringen Löslichkeit nur unbefriedigend tosylieren. Während in Dimethylformamid (DMF) und in Pyridin die Einwirkung von Tosylchlorid zu unkontrollierbaren Reaktionen führte, überwogen in Pyridin bei Gegenwart von Triäthylamin die acylierenden Eigenschaften des Tosylchlorids.

¹⁾ II. Mitteil.: H. NIEDRICH und W. KNOBLOCH, J. prakt. Chem. 17, 263 [1962].

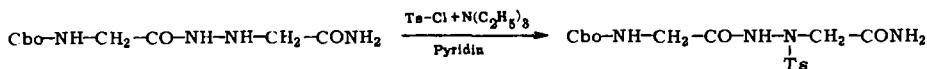
²⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem V. Europäischen Peptidsymposium, Oxford 1962.

³⁾ W. KNOBLOCH und H. NIEDRICH, J. prakt. Chem. 17, 273 [1962].

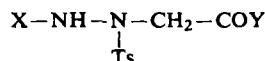
⁴⁾ J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 [1955].

⁵⁾ R. A. BOISSONAS und St. GUTTMANN, Helv. chim. Acta 43, 190, 200 [1960]; B. ISELIN und R. SCHWYZER, ebenda 45, 1499 [1962]; K. HOFMANN und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. 82, 3721 [1960].

Bei Anwendung von 1.2 Mol Tosylchlorid und Triäthylamin auf 1 Mol Cbo-Aminoacyl-hydrazinoessigsäureester oder -amid wurden 65–75-proz. Ausbeuten an N^{α} -Tosyl-Derivaten erhalten (s. Tab.). Eine Tosylierung der freien Säure gelang auf diese Weise nicht.



Tab. 1. Ausbeuten an N^{α} -Tosyl-Derivaten



X	Y	Ausb. (%)	Schmp. (°C)
1. Cbo-Glycyl	NH ₂	72	198–200
2. Cbo-L-Leucyl	NH ₂	75	199–200
3. Cbo-L-Prolyl-L-leucyl	NH ₂	65	171–172
4. Cbo-Glycyl	OC ₂ H ₅	75	107–109
5. Cbo-L-Leucyl	OCH ₃	ca. 90	nicht kristallin
Aus 4. und 5. durch Verseifung, Aminolyse und Hydrazinolyse			
6. Cbo-Glycyl	OH	186)	157–158
7. Cbo-Glycyl	NH ₂	ca. 706)	199–200
8. Cbo-Glycyl	NH-NH ₂	946)	154–156
9. Cbo-L-Leucyl	OH	146)	142–144

Während sich Cbo-Glycyl-hydrazinoessigester glatt aminolysieren und hydrazinolysieren lässt, führt die Verseifung zu unbefriedigenden Ergebnissen. Als Nebenreaktion findet u. a. Abspaltung des Tosylrestes statt, wie ein dabei isoliertes Produkt beweist. Der Tosylrest in N^{α} -Stellung ist gegen Hydrierung in Gegenwart von Palladiumkohle völlig, gegen Bromwasserstoff/Eisessig⁷⁾ überwiegend beständig, was eine selektive Abspaltung der Cbo-Schutzgruppe ermöglicht.

Die Bestimmung der Tosylabspaltung mit HBr/Eisessig erfolgte durch Titration mit NaOBr-Lösung in verdünnter Schwefelsäure⁸⁾. N^{α}, N^{β} -Diacyl-hydrazinoessigsäure-Derivate sind nicht oxydierbar. Durch Detosylierung daraus entstehendes N^{β} -Acyl-hydrazinoacetamid wurde mit einer gegen Glycyl-hydrazinoacetamid eingestellten NaOBr-Lösung titriert. Cbo-NH-CH₂-CO-NH-N(Ts)-CH₂-CONH₂ zeigte bei 20° in 4n HBr/Eisessig nach 10 Min. 2.3%, nach 20 Min. 3.5% und nach 40 Min. 7.2% Detosylierung. N^{β} -Prolyl-leucyl- N^{α} -tosyl-hydrazinoacetamid ergab nach Dünnschichtchromatographie bei 15 min. HBr/Eisessig-Einwirkung keine Anhaltspunkte für eine Detosylierung.

Aus den Hydrobromiden lassen sich mit Ammoniak oder Triäthylamin in wässriger Lösung die N^{α} -tosyierten Basen freisetzen. Die Sequenz Pro-Leu-Gly-Hya(Ts)-NH₂ (Hya = Hydrazinoacetyl) wurde wie folgt dargestellt:

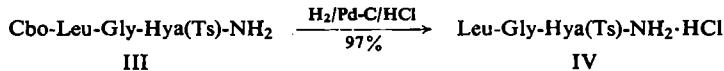
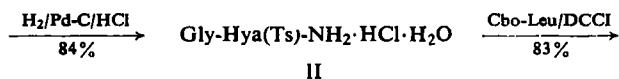
6) Bez. auf X-NH-NH-CH₂-CO₂R, da von nicht krist. Cbo-Gly-Hya(Ts)O₂C₂H₅ und Cbo-Leu-Hya(Ts)O₂CH₃ ausgegangen wurde (Hya = Hydrazinoacetyl).

7) D. BENISHAI und A. BERGER, J. org. Chemistry 17, 1564 [1952].

8) M. BRENNER und W. HOFER, Helv. chim. Acta 44, 1796 [1961].

Cbo-Gly-Hya(Ts)-R

Ia: R = OH

Ib: R = OC₂H₅Ic: R = NH·NH₂Id: R = NH₂

Pro-Leu-Hya(Ts)-NH₂ sowie Pro-Leu-Gly-Hya(Ts)-NH₂ lassen sich nach der Azidmethode mit *N*-geschützten Peptiden verknüpfen. Darüber wird an anderer Stelle berichtet werden. Die Abspaltung der Tosylgruppe gelingt mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Dabei muß auf strengsten Feuchtigkeitsausschluß geachtet werden, da es sonst zur hydrolytischen Spaltung der Hydrazidbindung kommt, wie die chromatographische Auswertung der Versuche an Cbo-Leu-Hya(Ts)-OH zeigt. Nach *N*^a-Tosylierung verhalten sich Hydrazinopeptide bei der Peptidsynthese wie normale Peptiderivate, soweit sie nicht mit starken OH-Ionenkonzentrationen in Berührung kommen. Hydrazinosäuren sind demnach wie Aminosäuren mit einer zusätzlichen basischen Gruppe zu behandeln.

Für zuverlässige technische Mitarbeit sei Fräulein E. LEPKE, für die Anfertigung der Mikroanalysen Frau F. KNOBLOCH und Frau N. SMIRNOWA gedankt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE⁹⁾

N^a-Tosyl-*N*^b-cbo-glycyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (Ib): 6.20 g (0.020 Mol) *N*^b-Cbo-Glycyl-hydrazinoessigsäure-äthylester werden in 40 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst. Unter Eiskühlung und Rühren gibt man 3.32 ccm Triäthylamin und 4.48 g (0.024 Mol) Tosylchlorid portionsweise hinzu. Man läßt die rötliche Mischung 1–2 Std. bei Raumtemperatur stehen und saugt dann vom ausgeschiedenen Triäthylaminhydrochlorid (ca. 3 g) ab. Das Filtrat wird i. Vak. zum Sirup eingeeengt, in Essigester (ca. 100 ccm) gelöst, mit 2*n* HCl, 2*n* KHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Der bräunliche, sirupöse Ester Ib (9.5 g) kristallisiert langsam nach kräftigem Verreiben mit 20 ccm absol. Äthanol. Ausb. 6.92 g (75%), Schmp. 107–109°.

C₂₁H₂₅N₃O₇S (463.5) Ber. C 54.42 H 5.44 N 9.07 Gef. C 54.49 H 5.45 N 9.37

N^a-Tosyl-*N*^b-cbo-glycyl-hydrazinoessigsäure (Ia): a) Zur Verseifung werden 8.50 g des sirupösen Esters Ib in 40 ccm Äthanol gelöst, 1.20 g NaOH (0.03 Mol) in 20 ccm Wasser hinzugefügt und nach 4 Std. das Äthanol abdestilliert. Der Rückstand, in Wasser gelöst,

⁹⁾ Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Heiztisch bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenproben wurden bei 80°/0.1–0.01 Torr 4–6 Std. über P₄O₁₀ getrocknet.

liefert beim Ansäuern ein Öl, welches in Essigester aufgenommen, mit Wasser geschüttelt und nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. eine schwer kristallisierende Masse ergibt. Verreiben mit wenig Äther liefert nach Tagen eine schmierigkristalline Masse (ca. 4.5 g). Aus Essigester fällt zuerst ein Produkt vom Schmp. 165–171° (0.6 g, vgl. c)). Aus der Mutterlauge kristallisiert nach längerer Zeit die rohe *Carbonsäure Ia*. Ausb. 1.45 g (18%), Schmp. 148–154°. 2 mal aus Nitromethan Schmp. 157–158°.



b) Zu einer mittels eines Vibromischers stark emulgierten Mischung aus 3.00 g *KHCO*₃, 80 ccm Wasser, 2.50 g *Tosylchlorid* und 50 ccm Äther gibt man im Verlauf von 2 Stdn. 3.09 g (10 mMol) *Cbo-Glycyl-hydrazinoessigsäure-äthylester*. Nach weiteren 6 Stdn. wird in Benzol aufgenommen, mit n HCl, n *KHCO*₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Die verbleibenden 1.80 g Sirup (39%) liefern beim Verseifen mit 250 mg NaOH 1.36 g (31%) eines Produktes vom Schmp. 172–173° (aus Wasser).

c) Nach Umkristallisieren aus Nitromethan schmilzt das unter a) erhaltene Nebenprodukt bei 172–174° und ist mit der nach b) erhaltenen Verbindung identisch. Es enthält keinen Schwefel, der Tosylrest ist demnach abgespalten. Für *Cbo-Glycyl-hydrazinoessigsäure*³⁾ (Schmp. 124–126°) wurden berechnet: C 51.25 H 5.38 N 14.94. Für das Produkt vom Schmp. 172–174° wurden gefunden: C 51.22 H 4.88 N 14.96. Die Verbindungen sind nicht identisch, wie Schmp. und Misch-Schmp. zeigen.

Hydrazid Ic: 3.0 g sirupöser *Äthylester Ib* werden in 10 ccm Äthanol gelöst und mit 1.5 ccm 90-proz. *Hydrazinhydrat* versetzt. Nach 4 Tagen werden Äthanol und überschüss. Hydrazinhydrat i. Vak. entfernt und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 2.7 g (94%), Schmp. 154–156°.

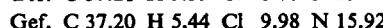


Amid Id: a) 6.30 g sirupösen *Äthylester Ib* lässt man in 50 ccm NH₃-gesätt. Methanol 26 Stdn. bei 20° stehen. Der vom Lösungsmittel befreite Rückstand kristallisiert beim Verreiben mit Äther. Ausb. 3.47 g (ca. 70%), Schmp. 199–200°.

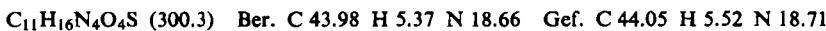
b) 1.40 g *Cbo-Glycyl-hydrazinoacetamid* (5 mMol) werden unter leichtem Erwärmen in 20 ccm wasserfreiem *Pyridin* gelöst und bei 0° mit 1.12 g (6 mMol) *Tosylchlorid* sowie im Verlauf von 2 Min. tropfenweise mit 0.83 ccm *Triäthylamin* versetzt. Nach Aufarbeitung wie oben wird der sirupöse Rückstand in einer Mischung aus 20 ccm Essigester und 20 ccm 10-proz. Salzsäure gelöst. Dabei scheidet sich das *Amid Id* ab, das nach 15 Min. abgesaugt und mit 10 ccm Wasser und 15 ccm Methanol gewaschen wird. Rohausb. 1.58 g (72%). Zur Reinigung wird in 4 ccm heißem DMF gelöst und mit 20 ccm Methanol wieder ausgefällt. Beim 10fachen Ansatz werden ca. 60% reines Produkt erhalten. Aus Nitromethan Schmp. 198–200°.



N^a-Tosyl-N^b-glycyl-hydrazinoacetamid-hydrochlorid-monohydrat (II): 8.7 g (0.02 Mol) *Amid Id* werden in 40 ccm DMF gelöst und durch Zugabe von 120 ccm Methanol schnell feinverteilt ausgefällt. Man gibt 3.3 ccm 20-proz. Salzsäure sowie ca. 1 g 10-proz. Palladium-Kohle hinzu und *hydriert*, bis kein farbloser Bodensatz mehr erkennbar ist. Nach Filtration wird i. Vak. eingeengt und das verbleibende *II* mit Methanol/Äther (1 : 2) verrieben. Rohausb. 85–95%. Zur Reinigung wird in Methanol gelöst und mit dem gleichen Vol. Äther ausgefällt. Ausb. 5.0 g (71%), Schmp. 208–212°.



Zur Gewinnung der freien *Base* werden 6.0 g *II-Hydrochlorid-monohydrat* in 15 ccm Wasser gelöst und mit *Ammoniak* auf pH 9.5 gestellt. Nach einiger Zeit kristallisieren 4.2 g *Base entspr. II* (80%, Schmp. 104–115°) aus. Umkristallisation aus wenig Wasser ergibt 3.5 g (69%). Aus Äthanol Schmp. 110–117°.



N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-leucylglycyl-hydrazinoacetamid (III): 3.5 g ca. 80-proz. *Cbo-L-Leucin* und 3.0 g *Base entspr. II* werden in der erforderlichen Menge Dioxan gelöst und mit 2.3 g *DCCI* unter Eiskühlung versetzt. Nach 12 Stdn. bei Raumtemperatur werden 0.5 ccm Essigsäure zugegeben, nach weiteren 30 Min. wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, die Lösung i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit *n* HCl, *n* KHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Es verbleiben 5.1 g kristalliner Rückstand, der aus Nitromethan umkristallisiert, 4.7 g *III* (77%, Schmp. 192–196°) ergibt. Aus Nitromethan Schmp. 200–202°. [α]_D²⁰: 6.0° (c = 1, in DMF).



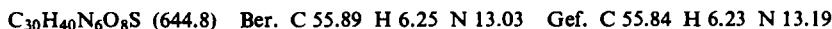
N^a-Tosyl-N^B-L-leucylglycyl-hydrazinoacetamid-hydrochlorid (IV): a) 3.3 g *III* in 100 ccm Methanol/1 ccm 20-proz. Salzsäure werden mit ca. 500 mg Pd-Kohle *hydriert*. Nach Aufarbeitung wie bei *II* erhält man 2.1 g (76%) glasartiges, papierchromatographisch einheitliches *IV*. Aus dem amorphen Hydrochlorid in Chloroform lässt sich die *Base* durch Triäthylamin aussäubern. Schmp. 172–174°.



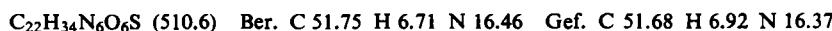
b) Man lässt unter starkem Röhren ca. 4*n* HBr in Eisessig (5 ccm/g) 20 Min. lang auf fein gepulvertes *III* einwirken, fällt mit dem 5–10fachen Vol. wasserfreiem Äther, reibt die zähe Masse mit frischem Äther kristallin, löst den Niederschlag in wenig Wasser, äthert 2 mal aus und stellt mit Triäthylamin auf pH 9. Die bald auskristallisierende *Base entspr. IV* wird mit wenig Wasser gewaschen und ist zur weiteren Umsetzung rein genug. Die Umkristallisation aus Wasser ist verlustreich infolge partieller Zers. Zur Analyse wurde die Substanz aus Äthanol mit Wasser gefällt. Schmp. 137–140°. (Polymorph mit der aus Chloroform gefällten *Base entspr. IV*) Ausb. 0.54 g. (65%) aus 1.1 g *III*. [α]_D²⁰: 8.4 ± 0.5° (c = 1, in DMF).



N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-prolyl-L-leucylglycyl-hydrazinoacetamid (V): 1.35 g (3 mMol) amorphes *IV* werden unter Zusatz von 0.48 ccm *Triäthylamin* in 5 ccm DMF gelöst. Nach Hinzufügen von 1.08 g *Cbo-Prolin-[p-nitro-phenylester]*¹⁰⁾ und einem Tropfen Eisessig lässt man die Mischung 3 Tage stehen. Ausgefallenes Triäthylamin-hydrochlorid wird abgesaugt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in Essigester gelöst und 4 mal mit *n* Ammoniaklösung ausgeschüttelt. Dabei scheidet sich *V* teilweise aus. Nach Abdestillieren des Essigesters bleiben 1.40 g (72%) Rohprodukt. Aus Nitromethan 1.02 g (52%), Schmp. 193–195°, [α]_D²⁰: -37.0 ± 1° (c = 1, in DMF).



N^a-Tosyl-N^B-L-prolyl-L-leucylglycyl-hydrazinoacetamid (VI): Man lässt auf 0.90 g *V* 3 ccm 4*n* HBr in Eisessig 15 Min. lang bei Raumtemperatur unter Röhren einwirken. Aufarbeitung wie bei *IVb*. Die *Base VI* scheidet sich als Öl aus, das nach kräftigem Reiben kristallisiert. Rohausb. 0.72 g, Schmp. 155–160°. Umfällen mit Wasser aus Äthanol liefert 0.40 g (56%), Schmp. 155–158°, [α]_D²⁰: -21.0 ± 1° (c = 0.5, in DMF).

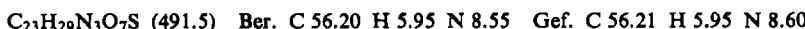


¹⁰⁾ M. BODANSZKY und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 [1959].

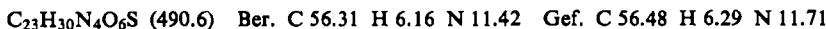
N^a-Benzolsulfonyl-N^B-cbo-glycyl-hydrazinoacetamid: Die Verbindung läßt sich analog Id erhalten, allerdings muß die Essigesterlösung i. Vak. eingeengt werden. Ausb. 0.82 g (39%). Aus Nitromethan Schmp. 152°.



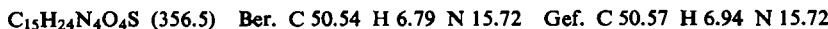
N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-leucyl-hydrazinoessigsäure: In ein Gemisch aus 3.50 g *Cbo-Leucyl-hydrazinoessigsäure-methylester*³⁾ (10 mMol) und 2.30 g *Tosylchlorid* in 30 ccm *Pyridin* läßt man bei 0° im Verlauf von 5 Min. 1.65 ccm *Triäthylamin* eintropfen. Nach Aufarbeitung wie bei Ia werden 4.60 g sirupöser *Ester* und daraus nach 3 stdg. Verseifung mit 12 ccm *n NaOH* 1.09 g (26%) Rohprodukt vom Schmp. 130—139° isoliert. 2 maliges Umlösen aus Essigester mit Hexan liefert ca. 700 mg *N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-leucyl-hydrazinoessigsäure* (14%), Schmp. 142—144°.



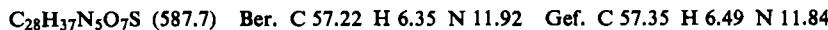
N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-leucyl-hydrazinoacetamid: Aus 1.70 g (5 mMol) *Cbo-Leu-Hya-NH₂*³⁾ werden analog Id 1.86 g (75%) *Cbo-Leu-Hya(Ts)-NH₂* erhalten. Die Aufarbeitung erfolgt durch mehrmaliges Schütteln der Essigesterlösung mit 2*n* HCl und Einengen i. Vak. Aus Nitromethan Schmp. 199—201°. $[\alpha]_D^{20}$: —10.5° (*c* = 1, in DMF).



N^a-Tosyl-N^B-L-leucyl-hydrazinoacetamid: Aus 1.00 g *Cbo-Leu-Hya(Ts)-NH₂* werden analog IVb 380 mg (52%) freie *Base* erhalten. (Hier ist bei der Ausfällung aus HBr/Eisessig Zusatz von Petroläther notwendig.) Aus Wasser Schmp. 151—153°.



N^a-Tosyl-N^B-cbo-L-proyl-L-leucyl-hydrazinoacetamid: Aus 2.15 g (5 mMol) *Cbo-Pro-Leu-Hya-NH₂* in 15 ccm Pyridin erhält man, wie bei *Cbo-Leu-Hya(Ts)-NH₂* beschrieben, einen Sirup, der beim Anreiben mit Äther kristallisiert. Ausb. 1.91 g (65%). Aus Nitromethan Schmp. 171—172°. Die Verbindung läßt sich auch durch Fällen aus DMF mit Äther reinigen. $[\alpha]_D^{20}$: —37.5° (*c* = 1, in DMF).



N^a-Tosyl-N^B-L-proyl-L-leucyl-hydrazinoacetamid: Aus 1.50 g vorstehender Verbindung werden analog IVb 0.98 g *Pro-Leu-Hya(Ts)-NH₂* (85%) erhalten. Die Umkristallisation aus Wasser ist verlustreich. Schmp. 192—194°. $[\alpha]_D^{20}$: —34° (*c* = 1, in DMF).

