

FRIEDRICH WEYGAND, WOLFGANG KÖNIG, RAOUL BUYLE und HEINZ GÜNTER VIEHE

Peptidsynthesen mit Inaminen

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München
und Union Carbide European Research Associates s. a., Brüssel

(Eingegangen am 25. Mai 1965)

Peptidsynthesen mit Benzyloxycarbonylaminosäuren und Aminosäureestern verlaufen mit Inaminen in hohen Ausbeuten¹⁾. Hierbei findet nach dem gaschromatographischen Racemisierungstest mit tert.-Butyläthynyl-dimethylamin, tert.-Butyläthynyl-diäthylamin und Äthyläthynyl-diäthylamin keine Racemisierung statt. Hingegen wurde mit Äthynyl-diäthylamin eine geringe Racemisierung gefunden. Gegenüber Dicyclohexylcarbodiimid ist bei Inaminen vorteilhaft, daß die gebildeten Säureamide in Petroläther löslich sind. — Bei der Kupplung von *N*-TFA-*L*-Valin oder *Z*-*L*-Leu-*L*-Phe-OH mit *H*-*L*-Val-OtBu tritt wie mit Dicyclohexylcarbodiimid Racemisierung auf.

Inamine erwiesen sich im Brüsseler Laboratorium¹⁾ als ausgezeichnete Reagenzien zur Herstellung der Peptidbindung. In zwei von vier Fällen wurden praktisch quantitative Ausbeuten an Benzyloxycarbonyl-dipeptid-estern erhalten, nämlich bei der Umsetzung von Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- γ -methylester mit *L*-Asparaginsäure-dimethylester (97%) und von Bis-benzyloxycarbonyl-*L*-cystin mit *L*-Asparaginsäure-dimethylester (99%). Bei der Kupplung von Benzyloxycarbonyl-*L*-alanin mit *L*-Glutaminsäure-dibenzylester und Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- γ -benzylester mit *L*-Glutaminsäure-dibenzylester betrugen die Ausbeuten 83 bzw. 78%.

Die beiden zuletzt genannten, bereits beschriebenen²⁾ Benzyloxycarbonyl-dipeptid-ester zeigten die angegebenen Drehungen. Da keine intensive Reinigung vorgenommen wurde, scheint keine merkliche Racemisierung aufgetreten zu sein.

Um die Frage der Racemisierung definitiv zu klären, wurde die gaschromatographische Diastereoisomerentrennung von *N*-Trifluoracetyl-dipeptid-methylestern herangezogen³⁻⁵⁾.

Benzyloxycarbonyl-*L*-valin wurde mit *L*-Valin-methylester mittels tert.-Butyläthynyl-dimethylamin in Methylenchlorid bei 20° zu *Z*-*L*-Val-*L*-Val-OCH₃ umgesetzt und ebenso Benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanin mit *L*-Valin-tert.-butylester in Tetrahydrofuran bei 40°. Die beiden Benzyloxycarbonyl-dipeptid-ester wurden entsprechend den

¹⁾ R. Buyle und H. G. Viehe, Angew. Chem. 76, 572 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 582 (1964).

²⁾ H. Sachs und E. Brand, J. Amer. chem. Soc. 75, 4608 (1953).

³⁾ F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, Angew. Chem. 75, 282 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 183 (1963).

⁴⁾ A. Prox, F. Weygand, W. König und L. Schmidhammer, Proceedings of the Sixth European Peptide Symposium, Athen 1963, Pergamon Press (im Druck).

⁵⁾ H. C. Beyerman, W. Maassen van den Brink, F. Weygand, A. Prox, W. König, L. Schmidhammer und E. Nintz, Recueil Trav. Chim. Pays-Bas 84, 213 (1965).

angegebenen Vorschriften^{3,5)} in die *N*-Trifluoracetyl-dipeptid-methylester verwandelt, die nach der gaschromatographischen Untersuchung nur aus den L-L-Peptiden bestanden. Daher erfolgt die Peptidsynthese mit dem tert.-Butyläthynyl-dimethylamin bei der Verknüpfung einer Benzyloxycarbonylaminosäure mit einem Aminosäureester vollkommen racemisierungsfrei.

In gleicher Weise wurde die Synthese von Z-L-Val-L-Val-OCH₃ unter Verwendung anderer Inamine untersucht. In Tab. 1 sind die Resultate zusammen mit den erzielten Ausbeuten aufgeführt. Mit Ausnahme des Äthynyl-diäthylamins erfolgte keinerlei

Tab. 1. Synthese von Z-L-Val-L-Val-OCH₃ aus Z-L-Val-OH und H-L-Val-OCH₃ in THF bei 40°

Inamin R—C≡C—R' R R'	Zeit (Std.)	%Ausb.	Schmp.	%DL-Verb.	Analyse Ber. C H N	62.61	7.74	7.69
t.Bu (CH ₃) ₂ N	1	64 50*)	96—103° 98—103°*)	0	Gef.	62.52	7.69	7.65
	4	80	100—105°	0	Gef.	62.94	8.07	7.57
t.Bu (C ₂ H ₅) ₂ N	1	77.5	102—106°	0	Gef.	62.69	7.99	7.58
Äthyl (C ₂ H ₅) ₂ N	1	87	100—105°	0	Gef.	62.95	7.83	7.55
Methyl (CH ₃) ₂ N	1	51	96—101°	0	Gef.	62.88	7.92	7.57
H (C ₂ H ₅) ₂ N	1	25	101—105°	2.5	Gef.	62.90	7.77	7.56
Methyl Piperidino	1	41.5	100—104°	0	Gef.	62.59	7.85	7.40
Phenyl (CH ₃) ₂ N	1	79 (klebrig) 49.5*)	70—89° 90—97°*)	0	Gef.	62.83	7.67	7.85
		79.5 (gelb)	99—104°	0	Gef.	—	—	—
Phenyl (C ₂ H ₅) ₂ N	1				Gef.	64.01	7.60	7.46
					Gef.	63.73	7.92	7.57
t.Bu C ₆ H ₅ (CH ₃)N	1	0	—	—		—	—	—

*) Einmal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Schmp. von authent. ⁶⁾ Z-L-Val-L-Val-OCH₃ 100—103°.

Racemisierung. Für die praktische Verwendung schlagen wir tert.-Butyläthynyl-dimethylamin oder n-Butyläthynyl-diäthylamin bzw. Äthyläthynyl-diäthylamin vor, wobei günstig ist, daß die aus den Inaminen gebildeten Säureamide in Petroläther löslich sind. Weniger eignen sich Phenyläthynyl-dimethylamin bzw. Phenyläthynyl-diäthylamin, da sie unreine Produkte liefern. Mit tert.-Butyläthynyl-methyl-phenylamin wurde kein Peptid gebildet.

Bei der Herstellung von *N*-Trifluoracetyl-dipeptid-estern aus *N*-Trifluoracetyl-aminosäuren und Aminosäureestern tritt, wie im Falle der Verknüpfung von *N*-Trifluoracetyl-L-valin mit L-Valin-tert.-butylester gezeigt wurde, erhebliche Racemisierung auf (Tab. 2). Außerdem sind die Ausbeuten gering. Dies beruht auf der intermediären Bildung von Pseudooxazolonen, die mit Inaminen im Verhältnis 1:1 eine Addition eingehen⁷⁾.

Um die Verwendbarkeit der Inamine zur Verknüpfung von Peptiden zu prüfen, wurde Z-L-Leu-L-Phe-OH mit L-Valin-tert.-butylester mittels tert.-Butyläthynyl-dimethylamin kondensiert. Nach der üblichen Partialhydrolyse mit 8.5*n* methanol.

⁶⁾ J. W. Hinman, E. L. Caron und H. N. Christensen, J. Amer. chem. Soc. 72, 1620 (1950).

⁷⁾ Siehe hierzu eine später erfolgende Mitteilung.

Tab. 2. Synthese von *N*-TEA-Val-Val-OtBu aus *N*-TFA-L-Val-OH und H-L-Val-OtBu mit tert.-Butyläthynyl-dimethylamin in THF

Zeit (Std.)	Temp.	%Ausb.	Sintern	Schmp. *)	%DL- Verb.	Analyse			
						Ber.	C	H	N
1	40°	25	120°	154–158°	25	Gef.	52.15	6.36	7.26
2	40°	21.5	118°	146–158°	24	Gef.	52.17	7.52	7.02
5	40°	22.7	118°	155–158°	19.5	Gef.	52.07	6.35	7.07
24	40°	42	115°	148–155°	14.2	Gef.	52.16	7.68	7.27
24	20°	32.5	115°	145–152°	16.7	Gef.	51.93	7.11	8.44

*) Lit. 8): Schmp. 120°.

Salzsäure und *N*-Trifluoracetylierung⁵⁾ zeigte sich im *N*-TFA-Phe-Val-OCH₃ starke Racemisierung (Tab. 3). Bei der Verknüpfung von *Z*-L-Leu-L-Phe-OH mit L-Valin-methylester betrug die Ausbeute nach 4 Std. bei 40° nur 25 %, was wiederum auf der intermediären Bildung von Azlacton und dessen Anlagerung an das Inamin⁷⁾ beruht. Mit Äthyläthynyl-diäthylamin wurden nur Spuren an Tripeptidderivat gebildet.

Tab. 3. Racemisierungsuntersuchungen bei der Synthese von *Z*-Leu-Phe-Val-OtBu aus *Z*-L-Leu-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu mit tert.-Butyläthynyl-dimethylamin in Tetrahydrofuran

Temp.	Zeit (Std.)	Mol.-Äquivv. Inamin	D-Phe-L-Val (%)
0°	23.5	1.6	26.5
35°	1.7	1.6	20.6
35°	4	2.0	17.0
35°	4	1.0	22.3
50°	4	2.0	22.4
50°	4	1.0	21.3

Zur racemisierungsfreien Verknüpfung von optisch aktiven *N*-geschützten Peptiden mit Aminosäureestern oder Peptidestern sind die Inamine also noch weniger geeignet als Dicyclohexylcarbodiimid⁴⁾.

Herrn Prof. F. Arens dankt H. G. Viehe für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Allgemeine Vorschrift zur Peptidsynthese

Zur Lösung von 5.0 mMol *N*-Benzyloxycarbonyl-aminosäure und 5.0 mMol Aminosäureester in 30 ccm Tetrahydrofuran gibt man bei 40° langsam (innerhalb von etwa einer Stde.) 5.5 mMol Inamin in 25 ccm Tetrahydrofuran. Danach wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 1 *n* HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die folgenden 4 Dipeptid-derivate wurden aus Äther/Petroläther umkristallisiert.

N-Benzyloxycarbonyl- α -L-glutamyl-L-asparaginsäure-trimethylester: Ausb. 97 %, Schmp. 88°.

C₂₀H₂₆N₂O₉ (438.4) Ber. C 54.81 H 5.94 N 6.39 Gef. C 54.45 H 5.97 N 6.63

8) W. König, Dissertat. Techn. Hochschule München 1964, S. 131.

N,N'-Bis-benzyloxycarbonyl-L-cystinyl-bis-[L-asparaginsäure-dimethylester]: Ausb. 99%, Schmp. 82°, $[\alpha]_D^{25}$: -19.0° ($c = 2.1$ in Eisessig).

$C_{34}H_{42}N_4O_{14}S_2$ (794.8) Ber. C 51.41 H 5.28 N 7.05 Gef. C 51.70 H 5.60 N 7.05

N-Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-glutaminsäure-dibenzylester: L-Glutaminsäure-dibenzylester wurde durch Zugabe der äquiv. Menge Triäthylamin zur Lösung des Hydrochlorids in möglichst wenig Chloroform und Extraktion mit Äther zur Entfernung des gebildeten Triäthylammoniumchlorids dargestellt.

Ausb. 83% Dipeptidester, Schmp. 104° (wie 1. c.²⁾), $[\alpha]_D^{25}$: -17.2° ($c = 3.12$ in Eisessig) (Lit. 2): -16.6° .

N-Benzyloxycarbonyl- α -L-glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester: Ausb. 78%, Schmp. 104° (Lit. 2): 105°, $[\alpha]_D^{25}$: -10.3° ($c = 4$ in Eisessig) (Lit. 2): -10.4° .

N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-valin-methylester: Zu 412 mg *N*-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanin (1.00 mMol) und 131 mg L-Valin-methylester (1.00 mMol) in 2 ccm absol. Tetrahydrofuran gab man 140 mg tert.-Butyläthynyl-dimethylamin (1.1 mMol) in 2 ccm absol. Tetrahydrofuran und erwärmte 4 Stdn. auf 40°. Ausb. 25%.

$C_{29}H_{39}N_3O_6$ (525.6) Ber. C 66.26 H 7.48 N 7.99 Gef. C 65.51 H 7.35 N 7.96

Racemisierungsuntersuchungen

a) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-valin-methylester mit tert.-Butyläthynyl-dimethylamin (ohne Ausbeutebestimmung): Zu je 0.2 mMol *N*-Benzyloxycarbonyl-L-valin und L-Valin-methylester in 3 ccm Methylenchlorid gab man bei Raumtemperatur 40 mg tert.-Butyläthynyl-dimethylamin in 1 ccm Methylenchlorid, ließ 36 Stdn. stehen und arbeitete wie üblich auf.

Zur Abspaltung des Z-Restes⁹⁾ wurde der Rückstand in 1 ccm Trifluoressigsäure 45 Min. auf 80° erhitzt, die Trifluoressigsäure i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in 1 ccm Methanol gelöst. Dazu gab man zur Trifluoracetylierung¹⁰⁾ 1 ccm Trifluoressigsäure-methylester und Triäthylamin bis zur basischen Reaktion, ließ nun 8 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und verdampfte die Lösungsmittel i. Vak. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und mit 1 *n* HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wurde eingeeengt und gaschromatographiert. Hierbei zeigte sich nur der Peak des *N*-Trifluoracetyl-L-valyl-L-valin-methylesters.

b) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester mit tert.-Butyläthynyl-dimethylamin (ohne Ausbeutebestimmung): Zur Lösung von je 0.1 mMol *N*-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanin und L-Valin-tert.-butylester in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran gab man 25 mg tert.-Butyläthynyl-dimethylamin in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran und erwärmte 1 Stde. auf 40°. Nach Eindampfen i. Vak. wurde in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet.

Durch Erhitzen in 1 ccm Trifluoressigsäure wurden beide Schutzgruppen abgespalten⁵⁾. Die Trifluoressigsäure wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Nun wurde mit dem schwach basischen Ionenaustauscher Lewatit MIH 59 bis zur neutralen Reaktion gerührt, dann der Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt, worauf die wäbr. Lösung i. Vak. eingedampft wurde. Das Dipeptid ließ man zur Veresterung 20 Stdn. bei Raumtemperatur in 0.5 *n* methanol. HCl stehen. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurde wie bei a) *N*-trifluoracetyliert. Die gaschromatographische Prüfung zeigte nur *N*-Trifluoracetyl-L-phenylalanyl-L-valin-methylester an.

⁹⁾ F. Weygand und W. Steglich, Z. Naturforsch. 14b, 472 (1959).

¹⁰⁾ F. Weygand und R. Geiger, Chem. Ber. 92, 2099 (1959).

c) *N-Benzoyloxycarbonyl-valyl-valin-methylester* (mit Ausbeutebestimmung): 1.26 g *N-Benzoyloxycarbonyl-L-valin* (5.00 mMol) und 0.66 g *L-Valin-methylester* (5.00 mMol) wurden in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran suspendiert. Man erwärmte auf 40° und ließ langsam innerhalb von 45 Min. 5.5 mMol *Inamin* (s. Tab. 1) in 25 ccm Tetrahydrofuran unter gelegentlichem Umschütteln zutropfen. Hierbei entstand eine klare Lösung. Nach 1 bzw. 4 Stdn. (s. Tab. 1) wurde i. Vak. eingedampft, in Essigester aufgenommen und mit verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Kristallisation erfolgte aus Petroläther.

$\frac{1}{10}$ der Essigesterlösung wurde für die gaschromatographischen Racemisierungsuntersuchungen entnommen und nach Vorschrift a) in den *N-Trifluoracetyl-valyl-valin-methylester* verwandelt. Alle Peptidsynthesen mit Inaminen verliefen racemisierungsfrei, ausgenommen diejenige mit Äthynyl-diäthylamin (s. Tab. 1).

d) *N-Trifluoracetyl-valyl-valin-tert.-butylester* (mit Ausbeutebestimmung): 1.07 g (5.00 mMol) *N-Trifluoracetyl-L-valin* und 0.87 g (5.00 mMol) *L-Valin-tert.-butylester* in 30 ccm Tetrahydrofuran wurden innerhalb von 45 Min. mit der Lösung von 0.69 g *tert.-Butyläthynyl-dimethylamin* in 25 ccm Tetrahydrofuran versetzt. Die Reaktionszeit und die Temperatur wurden variiert (s. Tab. 2). Nach der üblichen Aufarbeitung erfolgte Kristallisation aus Petroläther.

Die für die Racemisierungsuntersuchungen bestimmten Proben wurden folgendermaßen aufgearbeitet: Das Lösungsmittel wurde i. Vak. verdampft, der Rückstand in 2 ccm *Trifluoressigsäure* 15 Min. auf 80° erhitzt, die Trifluoressigsäure i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in wenig Tetrahydrofuran gelöst. Diese Lösung wurde nun tropfenweise mit äther. *Diazomethan*-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Einengen i. Vak. wurde gaschromatographiert, wobei sich starke Racemisierung zeigte (vgl. Tab. 2).

e) *N-Benzoyloxycarbonyl-leucyl-phenylalanyl-valin-tert.-butylester* aus *N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanin* und *L-Valin-tert.-butylester* mit *tert.-Butyläthynyl-dimethylamin* (ohne Ausbeutebestimmung): Zur Lösung von je 0.1 mMol *N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanin* und *L-Valin-tert.-butylester* in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran wurden die in Tab. 3 angegebenen Mengen *tert.-Butyläthynyl-dimethylamin*, gelöst in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran, gegeben. Temp., Reaktionszeit und Menge an *Inamin* wurden variiert (Tab. 3). Wie unter b) angegeben, wurde zum freien Tripeptid aufgearbeitet. Zur Partialhydrolyse unter Veresterung wurde es in 4 ccm 8.5 *n* methanol. Salzsäure 24 Stdn. auf 70° erhitzt. Sodann wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand, wie unter a) angegeben, *N*-trifluoracetyliert. Die gaschromatographische Untersuchung ergab, daß Phenylalanin stark racemisiert war.

Gaschromatographische Bedingungen

Alle gaschromatographischen Racemisierungsuntersuchungen wurden an einer 50-m-Stahlkapillare durchgeführt. Gerät: Perkin-Elmer Fraktometer 116 E. Stationäre Phase: Polyphenyläther OS 138 (Golay-Säule OS 138). Trägergas: Stickstoff. Detektor: Flammenionisationsdetektor.

Gaschromatographische Daten für die verschiedenen Sequenzen

Sequenz	Strömungs- geschwindigkeit (ccm/min)	Temp.	Teilungs- verhältnis
TFA-Val-Val-OCH ₃	0.7	180°	1/40—1/60
TFA-Leu-Phe-OCH ₃	1.62	210—220°	1/20—1/30
TFA-Phe-Val-OCH ₃	1.62	210—220°	1/20—1/30

[243/65]