

Erich Wünsch und Reinhard Spangenberg

## Die *N*-[Cyan-*tert*.-butyloxycarbonyl]-Gruppe (CyOC), eine durch $\beta$ -Eliminierung abspaltbare Aminoschutzgruppe

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 21. April 1971)

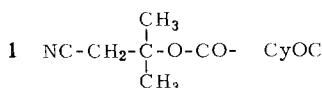
■  
Als neue, mit schwach basischen Reagenzien durch „ $\beta$ -Eliminierung“ abspaltbare Aminoschutzgruppe wurde der *N*-[Cyan-*tert*.-butyloxycarbonyl]-Rest erkannt. Die Einführung dieser *N*-Maskierung gelingt mit Hilfe des entsprechenden Chlorameisensäureesters. Die erhaltenen [Cyan-*tert*.-butyloxycarbonyl]-aminoäuren lassen sich z. B. nach dem Aktivester-Verfahren peptidsynthetisch umsetzen — dies wird an Hand der gelungenen Synthese von Glycyl-L-tryptophan demonstriert.

### The *N*-(Cyano-*tert*-butoxycarbonyl) Group (CyOC), a Novel Amino Protective Group, Removable by $\beta$ -Elimination

The *N*-(cyano-*tert*-butoxycarbonyl) residue is a new amino protective group which can be cleaved with weakly basic reagents *via*  $\beta$ -elimination. The introduction of this *N*-masking moiety is possible by means of the appropriate chloroformic acid ester. The resulting (cyano-*tert*-butoxycarbonyl)amino acids can be coupled with amino acids and peptides using the active ester procedure as it is demonstrated by the synthesis of glycyl-1-tryptophan.

■  
Vor kurzem haben *Carpino* und Mitarb.<sup>1)</sup> die [Fluorenyl-(9)-methoxycarbonyl]-Schutzgruppe (FMOC) als im basischen Medium leicht abspaltbare, säurestabile Aminoschutzgruppe beschrieben. Ihre Stabilität unter den Bedingungen der Peptidsynthesen wurde nicht überprüft.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über modifizierte BOC-Schutzgruppen zeigte sich, daß die [Cyan-*tert*.-butyloxycarbonyl]-Gruppe (1) (CyOC-Gruppe) ähnliche Eigenschaften aufweist. Die Stabilität der *N*-Maskierung ist für Peptidsynthesen durchaus geeignet; dies konnte am Beispiel einer Glycyl-tryptophan-Darstellung demonstriert werden.



Cyan-*tert*.-butylalkohol<sup>2)</sup> läßt sich nach *Carpino* und Mitarb.<sup>3)</sup> in Methylenchlorid mit Phosgen/Pyridin zum Chlorameisensäureester umsetzen; dieser wird ohne weitere Charakterisierung mit Glycin in THF/Wasser bei pH 8.5 aminolysiert: Es resultiert

<sup>1)</sup> *L. A. Carpino* und *G. Y. Han*, *J. Amer. chem. Soc.* **92**, 5748 (1970).

<sup>2)</sup> *A. Kjaer* und *R. B. Jensen*, *Acta chem. scand.* **12**, 1746 (1958).

<sup>3)</sup> *L. A. Carpino*, *K. N. Parameswaran*, *R. K. Kirkley*, *J. W. Spiewak* und *E. Schmitz*, *J. org. Chemistry* **35**, 3291 (1970).

CyOC-Gly-OH in 82proz. Ausbeute. Dieses lässt sich nach dem Hydroxysuccinimidester-Verfahren z.B. mit Tryptophan in Dimethylformamid unter Zusatz von zwei Äquivalenten *N*-Methyl-morpholin zu CyOC-Gly-Trp-OH (85% Ausb.) vereinigen.

CyOC-Gly-Gly-OH entsteht hierbei nicht -- ein Produkt, das zu erwarten wäre, wenn die verwendete *N*-Schutzgruppe unter den bei der Peptidverknüpfung herrschenden Reaktionsbedingungen auch nur teilweise abgespalten würde.

Die Abspaltung der *N*-Schutzgruppe gelingt mit wäßriger Kaliumcarbonat- oder Triäthylaminlösung bei pH 10. Das erhaltene Glycyl-L-tryptophan war dünnenschichtchromatographisch einheitlich, seine spezifische Drehung übereinstimmend mit einem Präparat, das nach einem anderen Verfahren hergestellt worden war.

Die Stabilität der CyOC-Gruppe gegenüber wasserfreier Trifluoressigsäure ist relativ hoch; nach 2stdg. Stehenlassen in Trifluoressigsäure von CyOC-Gly-OH bei Raumtemperatur war chromatographisch kein freies Glycin nachweisbar -- erst nach 24stdg. Reaktion war ca. die Hälfte der *N*-Schutzgruppe entfernt.

### Beschreibung der Versuche<sup>4)</sup>

1. *{Cyan-tert.-butyloxycarbonyl}-glycin* [CyOC-Gly-OH]: 10 g (100 mMol) *Cyan-tert.-butylalkohol*<sup>2)</sup> und 10 g (125 mMol) Pyridin werden in ca. 150 ccm Methylchlorid bei ca. -40° mit 40 ccm (600 mMol) *Phosgen* von ca. -70° versetzt. Nach Röhren über Nacht bei Raumtemp. wird mit eiskalter 1*n* HCl extrahiert, zweimal mit Eiswasser gewaschen, sofort durch mehrmaliges Schütteln mit frischem Natriumsulfat getrocknet (sämtliche wäßrige Phasen und das Natriumsulfat werden je zweimal mit wenig Methylchlorid nachgewaschen) und i. Vak. bei 20° Badtemp. eingedampft. Rohausb. an *Chlorameisensäure-[cyan-tert.-butylester]* 17 g (quantitat.).

Der rohe Ester wird mit ca. 100 ccm THF aufgenommen und unter Außenkühlung mit Eiswasser in etwa 15 Min. zu einer Lösung von 15 g (200 mMol) *Glycin* in 200 ccm 1*n* NaOH getropft. Nach einer weiteren Stde. Röhren bei Raumtemp. zeigt das Reaktionsgemisch einen pH-Wert von ca. 8. Es wird mit 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 4-5 gebracht, i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit Essigester/Wasser ausgeschüttelt, bis alles gelöst ist, die wäßrige Phase abgetrennt, weiter bis auf pH 1.5-2 angesäuert und noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge werden mit Wasser sulfatfrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Äther/Petroläther. Nach Trocknen i. Vak. Schmp. 147-148.5°. Ausb. 16.5 g (82%).

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (200.1) Ber. C 48.02 H 6.00 N 14.00 O 31.98

Gef. C 48.05 H 6.13 N 13.81 O 32.14

Dünnschichtchromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45:45:10).

2. *{Cyan-tert.-butyloxycarbonyl}-tryptophan* [CyOC-Trp-OH]: Analog der vorstehenden Vorschrift ergeben 10 g (100 mMol) *Cyan-tert.-butylalkohol*<sup>2)</sup> und 41 g (200 mMol) *Tryptophan* 35 g (quantitat.) öliges *{Cyan-tert.-butyloxycarbonyl}-tryptophan*, das aus ätherischer Lösung mit 18 g (100 mMol) *Dicyclohexylamin* gefällt wurde. Nach Trocknen i. Vak. Schmp. 161-163°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +12.9°; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +10.9° (c = 1, in Äthanol). Ausb. 46 g (90%).

(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (510.7) Ber. C 68.20 H 8.29 N 10.92 O 12.53

Gef. C 68.02 H 8.43 N 10.64 O 12.36

Dünnschichtchromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45:45:10) nach Zerlegen mit wäßrigem Kaliumhydrogensulfat/Essigester.

<sup>4)</sup> DCCD = *Dicyclohexylcarbodiimid*, HOSU = *N*-Hydroxy-succinimid, DCHA = *Di-cyclohexylamin*.

3. *[Cyan-tert.-butyloxycarbonyl]-glycyl-L-tryptophan* [CyOC-Gly-Trp-OH]: 1.0 g (5 mMol) CyOC-Gly-OH in 30 ccm THF werden mit 1.1 g DCCD (5 mMol) und 600 mg (5 mMol) HOSU über Nacht bei 0° gerührt. Man saugt vom Harnstoff ab und dampft ein. Der kristalline Rückstand, CyOC-Gly-OSU, wurde ohne weitere Reinigung und Charakterisierung mit 1.02 g (5 mMol) Tryptophan und 1.0 g (10 mMol) *N*-Methyl-morpholin in ca. 50 ccm DMF bei 0° gerührt, bis das Tryptophan gelöst war (3–4 Stdn.). Nach Stehenlassen über Nacht in der Kühltruhe wird mit 1.4 g (10 mMol) KHSO<sub>4</sub> in ca. 20 ccm Wasser versetzt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird wie üblich aufgearbeitet (Verteilen zwischen Essigester und Wasser, Waschen und Trocknen der Essigesterphase). Nach Eindampfen der Essigesterphase verbleiben ca. 2.5 g (quantitat.) eines zähen Öls, das mit 900 mg (5 mMol) DCHA aus Essigester/Äther als amorphes Pulver gefällt wurde. Das Produkt erreicht zwischen 104 und 110° ohne scharfen Schmp.,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +22.5°,  $[\alpha]_{578}^{20}$ : +19.8°;  $[\alpha]_{D}^{20}$ : +18.9° (c = 1.1, in Äthanol). Ausb. an DCHA-Salz 2.5 g (85%).

(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O (585.7) Ber. C 63.52 H 8.08 N 11.95 O 16.38  
Gef. C 63.59 H 7.82 N 11.58 O 16.87

#### 4. Glycyl-L-tryptophan [H-Gly-Trp-OH]

a) 200 mg (0.35 mMol) CyOC-Gly-Trp-OH·DCHA werden wie üblich<sup>5)</sup> zerlegt und mit einer Lösung von 150 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 3 ccm Wasser 6 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Danach war dünnschichtchromatographisch kein *N*-geschütztes Dipeptid mehr nachzuweisen (Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1). Die leicht hellbraune Lösung wird mit Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) auf pH 5 gebracht, vom Ionenaustauscher abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird mit wenig Methanol/Äther digeriert und abgesaugt.  $[\alpha]_D^{20}$ : +29.7 ± 1° (c = 1, in 5n HCl). Ausb. 85 mg (90%). Chromatographisch rein in Butanol/Essigester/Wasser (3:1:1).

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>·1.5 H<sub>2</sub>O (288.3) Ber. C 54.10 H 6.25 N 14.58 Gef. C 53.9 H 6.08 N 14.45

b) 3.1 g (10 mMol) Z-Gly-OSU und 2.0 g (10 mMol) L-Tryptophan werden in 50 ccm DMF in Gegenwart von 2 g (20 mMol) *N*-Methyl-morpholin ca. 16 Stdn. bei 0° gerührt. Neutralisation mit wässriger Kaliumhydrogensulfat-Lösung, Entfernen des DMF bei 10<sup>-2</sup> Torr, Verteilen des Rückstandes zwischen Essigester und Wasser, Waschen, Trocknen und Eindampfen der Essigesterphase ergab 3.1 g (78%) öliges Z-Gly-Trp-OH, das dünnschichtchromatographisch rein war und wie üblich in ca. 100 ccm 80proz. Methanol an Pd-Schwarz hydriert wurde. Nach Trocknen bei 10 Torr:  $[\alpha]_D^{20}$ : +29.7 ± 1° (c = 1, in 5n HCl), Ausb. 2.15 g (95%).

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>·1.5 H<sub>2</sub>O (288.3) Ber. C 54.10 H 6.25 N 14.58 Gef. C 53.83 H 6.08 N 14.42

K. R. Rao, S. M. Birnbaum, R. B. Kingsley und J. P. Greenstein (J. biol. Chemistry **198**, 507 (1952)) finden  $[\alpha]_D^{25}$ : +34.4°. Eine Umrechnung des von uns gefundenen Drehwerts auf wasserfreie Substanz ergibt  $[\alpha]_D^{20}$ : +31.9°.

<sup>5)</sup> R. Spangenberg, P. Thamm und E. Wiunsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **352**, 655 (1971).