

Günter Losse und Wolfgang Gödicke

## Über neue, kristalline *N*-Carbonyl-aminosäureester

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Dresden und dem Institut für Kortiko-Viscerale Pathologie und Therapie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

(Eingegangen am 27. April 1967)

Die Darstellung von kristallinen *N*-Carbonyl-aminosäureestern mehrfunktioneller Aminosäuren und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Peptidchemie wird beschrieben.

*Goldschmidt* und *Wick*<sup>1)</sup> benutzten die von *Wurtz*<sup>2)</sup> entdeckte Umsetzung von Isocyansäureestern mit Carbonsäuren erstmalig zur Darstellung von Peptiden. Obwohl diese Methode der Peptidsynthese heute nur noch begrenzte praktische Bedeutung hat, sind die *N*-Carbonyl-aminosäureester ( $\alpha$ -Isocyanato-fettsäureester) insbesondere im Hinblick auf die Einführung einer Reihe von Urethanschutzgruppen weiterhin wichtige aktivierte Aminosäurederivate. Die meisten der bisher bekannten einfachen *N*-Carbonyl-aminosäureester sind Flüssigkeiten, die sich schwer rein darstellen und handhaben lassen<sup>1,3)</sup>. Es sind daher verschiedene Wege eingeschlagen worden, um zu kristallinen Derivaten dieser Verbindungsklasse zu gelangen<sup>4,5)</sup>.

Im folgenden soll daher eine Reihe von neuen, kristallinen *N*-Carbonyl-estern geschützter polyfunktioneller Aminosäuren beschrieben werden. Als Estergruppe wählten wir hierbei den Benzyl-, *p*-Nitrobenzyl- und *p*-Nitrophenyl-Rest, also Gruppen, die in der Peptidsynthese als C-Schutz bzw. direkt zur Kettenverlängerung genutzt werden können.

Die in Tab. 1<sup>6)</sup> angeführten *N*-Carbonyl-ester wurden durch direkte Phosgenierung der Aminosäureester-hydrochloride oder -hydrobromide in Benzol oder Toluol erhalten<sup>1b)</sup>. Sie sind im allgemeinen gut haltbar. Gegenüber Verbindungen mit aktiven Wasserstoffatomen besitzen sie unterschiedliche Reaktivität. Relativ langsam reagieren die *N*-Carbonyl-bis-*[p*-nitro-benzylester] der Aminodicarbonsäuren. Wie die Molekulargewichtsbestimmung und der Vergleich der IR-Spektren mit Sicherheit zeigen, liegen sie nicht in oligomerer Form vor.

1) 1a) *St. Goldschmidt* und *M. Wick*, Z. Naturforsch. **5b**, 170 (1950); 1b) *Liebigs Ann. Chem.* **575**, 217 (1952).

2) *Ch. A. Wurtz*, *Liebigs Ann. Chem.* [3] **42**, 53 (1854).

3) *St. Goldschmidt*, *W. Lautenschläger*, *B. Kolb* und *G. Zumach*, *Chem. Ber.* **97**, 2434 (1964).

4) *J. Gante*, *Angew. Chem.* **78**, 334 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 315 (1966).

5) *G. Losse* und *H. Vietmeyer*, *J. prakt. Chem.* (4) **32**, 204 (1966).

6) Abkürzungen: Bzl = Benzyl, OBzl = Benzylester, ONb = *p*-Nitro-benzylester, ONp = *p*-Nitro-phenylester, Z = Benzylloxycarbonyl, Boc = tert.-Butylloxycarbonyl, Foc = Furfuryloxycarbonyl. — Bezeichnungen nach IUPAC Information Bull. Nr. 25, S. 32 (1966), abgedruckt auch in *J. biol. Chemistry* **241**, 2491 (1966), *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **121**, 1 (1966), und *Biochemistry* **5**, 2485 (1966); deutsche Übersetzung: *Hoppe-Seyler's Z. physiol.* **348**, 256 (1967).

Tab. 16). Dargestellte N-Carbonyl-aminosäureester

Nr.	Verbindung	Ausb. (%)	Schmp.	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	c	Summenformel Mol.-Gew.	Analyse		
							Ber. Gef.	C	H N
1	N-CO-L-Cys(Bzl)-OBzl	91.5	14–16°	–61.0°	2.0 (Benzol)	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S (327.4)	66.03 65.96	5.23 5.25	4.28 4.30
2	N-CO-L-Cys(Bzl)-ONb	87.8	102–104°	–74.2°	2.0 (Benzol)	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S (372.1)	58.06 58.02	4.33 4.24	7.52 7.49
3	N-CO-L-Cys(Bzl)-ONp	98.5	57–58°	–33.9°	1.0 (Benzol)	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S (358.4)	56.97 56.92	3.94 3.93	7.82 7.96
4	N-CO-L-Glu(ONb)-ONb	95.8	155°	–3.2°	3.0 (DMF)	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> (443.4)	54.18 54.13	3.87 4.08	9.48 9.38
5	N-CO-L-Asp(ONb)-ONb	89.7	151–152°	–6.4°	1.0 (DMF)	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> (429.3)	53.15 53.44	3.52 3.60	9.79 9.60
6	N-CO-L-Tyr(Z)-OBzl	92.0	60–61°	–69.4°	2.0 (Benzol)	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub> (431.4)	69.60 69.32	4.91 4.91	3.25 3.30
7	N-CO-L-Tyr(Z)-ONb	92.8	53–55°	–39.4°	2.0 (Benzol)	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (476.4)	63.02 63.14	4.23 4.02	5.88 6.21
8	N-CO-L-Phe-ONp	96.8	74°	–43.4°	2.0 (Benzol)	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (312.3)	61.54 61.49	5.87 3.91	8.97 9.05

Die Umsetzung dieser N-Carbonyl-ester mit Benzylalkohol, tert.-Butylalkohol oder Furfurylalkohol unter üblichen Bedingungen<sup>1b, 7, 8)</sup> führt in guter Ausbeute zu den entsprechenden Z-, Boc- und Foc-Aminosäureestern.

Zur direkten carboxylseitigen Kettenverlängerung von N-geschützten Aminosäuren sind die N-Carbonyl-ester dagegen nur bedingt verwendbar. Tab. 2 zeigt die bei der Umsetzung von N-Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin mit N-Carbonyl-glycin-äthylester nach dem Anderson-Callahan-Test<sup>9)</sup> unter verschiedenen Bedingungen ermittelten Racemisierungsgrade.

Tab. 2<sup>6)</sup>. Racemisierungsgrad bei der Umsetzung von N-Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin mit N-Carbonyl-glycin-äthylester

Lösungs- mittel	Pyridin/ N-Carbonyl- glycin- äthyl- ester (Mol)	Reakt.- Temp.	Zeit (Stdn.)	Gesamt- ausb. Z-Tri- peptid- ester (%)	Z-Gly-Phe-Gly-OÄt Anteile im Rohprodukt		Ausb. Z-Gly- DL-Phe (%)
					% DL	% L	
Toluol	0.75	90°	1.5	74.1	30	54	
Toluol	0.75	90°	1.5	69.7	29	60	19.8
—	—	130°	3	68	44	37.2	18
Benzol	0.38	0°	48	76.5	23.5	73	14.7
CHCl <sub>3</sub>	0.11	61°	1	60.5	18.9	69.8	29
CHCl <sub>3</sub>	0.06	50°	1	53.6	8.9	72.5	

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind korrigiert. Die Reinheit der Aminosäureester wurde durch aufsteigende Papierchromatographie im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1; Papier Nr. 2043a der Fa. Schleicher & Schüll) kontrolliert. Die Peptide wurden auf Dünnschichtplatten aus Kieselgel chromatographiert. Laufmittel: System A: n-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2), System B: Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig (3 : 2 : 1).

<sup>7)</sup> G. W. Anderson und A. C. McGregor, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

<sup>8)</sup> H. Jeschkeit, G. Losse und K. Neubert, Chem. Ber. **99**, 2803 (1966).

<sup>9)</sup> G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2902 (1958).

Gly-ONp·HBr, L-Cys(Bzl)-ONp·HBr und L-Phe-ONp·HBr wurden nach Goodman und Stueben<sup>10)</sup> dargestellt.

1. *Allgemeine Darstellung der Sulfonate der Aminosäure-benzylester und -[p-nitro-benzylester]*<sup>11)</sup>: 0.1 Mol Aminosäure werden mit 0.11 Mol Benzolsulfonsäure · 1.5 H<sub>2</sub>O (bzw. p-Toluolsulfonsäure · 1 H<sub>2</sub>O) und 0.2–0.4 Mol Benzylalkohol (bzw. 0.15–0.2 Mol p-Nitro-benzylalkohol; für Aminodicarbonsäuren nimmt man entsprechend mehr Alkohol) unter Zusatz von Benzol oder CCl<sub>4</sub> in einer Soxhlet-Apparatur mehrere Std. erhitzt. Als Trockenmittel dient Calciumchlorid.

Bei größeren Ansätzen empfiehlt es sich, die Hauptmenge des Wassers zuerst in einer Apparatur nach Dean und Stark abzutrennen. Anschließend entfernt man den Rest des Wassers wie beschrieben im Soxhlet-Apparat. Die Estersalze werden nach Einengen i. Vak. abgesaugt oder mit Äther gefällt. Ihre Kristallisation erfolgt aus Äthanol, Isopropylalkohol, Benzol oder Methanol/Äther. Detaillierte Angaben enthält Tab. 3 für die noch nicht beschriebenen Verbindungen.

2. *Allgemeine Darstellung der Aminosäure-benzylester- und -[p-nitro-benzylester]-hydrochloride*: 0.02 Mol feinverteiltes Benzolsulfonat (bzw. p-Toluolsulfonat) der Aminosäure-benzylester oder -[p-nitro-benzylester] werden in 100 ccm Chloroform suspendiert und mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von 0.04 Mol NaHCO<sub>3</sub> kräftig geschüttelt. Nachdem Lösung eingetreten ist, wird noch zweimal mit je 50 ccm Chloroform extrahiert. Die vereinigten Auszüge werden nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i. Vak. konzentriert und mit Äther versetzt, der bei 0° mit Chlorwasserstoff gesättigt wurde. Die Hydrochloride kristallisiert man nach Trocknung i. Vak. über Kaliumhydroxid aus Äthanol oder Methanol/Äther um. Tab. 4 gibt bisher nicht beschriebene Verbindungen wieder.

3. *Darstellung der N-Carbonyl-aminosäureester*: Die trockenen Esterhydrochloride (0.05 Mol) werden in ca. 200 ccm Toluol oder Benzol unter starkem Rühren suspendiert und unter Rückfluß gekocht. Über die Lösung wird 2–3 Std. ein kräftiger Phosgen-Strom geleitet. Anschließend destilliert man das Lösungsmittel i. Vak. ab und reinigt durch Umkristallisieren aus Benzol (bzw. Toluol) oder Umfällen aus Toluol/Petroläther (Tab. 1).

4. *Einführung von Urethan-Schutzgruppen*<sup>7,8)</sup>: 0.01 Mol N-Carbonyl-aminosäureester, 0.01–0.05 Mol des entsprechenden Alkohols, 0.05 ccm Pyridin und 25 ccm Benzol werden 2–4 Std. unter Rückfluß gekocht. Man destilliert das Lösungsmittel i. Vak. ab und reinigt durch Kristallisation. Im folgenden werden einige Beispiele angeführt:

*N-Benzoyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein-[p-nitro-phenylester]*: Ausb. 83%, Schmp. 93 bis 94° aus Äthanol,  $[\alpha]_D^{25}$ : –37.4° (c = 1.0, in Methanol). (Lit.<sup>12)</sup>: Schmp. 93–94°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –37°, c = 1, in Methanol.)

*N-Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanin-[p-nitro-phenylester]*: Ausb. 82%, Schmp. 127° aus Äthanol,  $[\alpha]_D^{25}$ : –24.2° (c = 2.0, in DMF). (Lit.<sup>13)</sup>: Schmp. 126–126.5°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –24.7°, c = 2.0, in DMF.)

*N-Benzoyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein-benzylester*: Ausb. 88%, Schmp. 66–67° aus Benzol/Petroläther,  $[\alpha]_D^{25}$ : –40.7° (c = 9.5, in Eisessig). (Lit.<sup>14)</sup>: Schmp. 66°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –42.1°, c = 9.5, in Eisessig.)

10) M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

11) J. E. Shields, W. H. McGregor und F. H. Carpenter, J. org. Chemistry **26**, 1491 (1961).

12) M. Bodanszky und V. Du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2504 (1959).

13) M. Bodanszky und V. Du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 6072 (1959).

14) D. Ben-Ishai und A. Berger, J. org. Chemistry **17**, 1564 (1952).

Tab. 36). Dargestellte, noch nicht beschriebene Sulfonate von Aminosäureestern

Benzolsulfonate von	Reaktions- dauer (Stdn.)	Ausb. (%)	Schmp.	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	c	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse			
							Ber. Gef.	C	H	N
L-Tyr(Z)-OBzl	14 (Benzol)	39.2	173—175°	+10.8°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub> [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> (563.6)	63.93 64.21	5.19 5.38	2.48 2.62	5.69 5.57
L-Tyr(Z)-ONb	20 (Benzol)	29	175—176.5°	+16.4°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> (608.2)	59.21 59.23	4.64 4.74	4.60 4.89	
D,L-Lys(Z)-OBzl	35 (CCl <sub>4</sub> )	53	122—123°	—	—	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> (528.6)	61.35 61.48	6.10 6.26	5.30 5.58	
L-His(Bzl)-ONb	10 (CCl <sub>4</sub> )	61	224—225°	+8.3°	1.5 (DMF)	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> [2C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> (696.7)	55.16 55.14	4.63 4.77	8.04 8.12	9.21 9.04
<i>p</i> -Toluolsulfonate von										
L-Glu(ONb)-ONb	30 (CCl <sub>4</sub> )	74.6	174—176°	+7.3° +7.2°	4.0 (DMF) 2.0 (Pyridin)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> (589.5)	52.97 52.81	4.61 4.70	7.12 7.12	
L-Tyr(Z)-OBzl	20 (CCl <sub>4</sub> )	39	196—197°	+15.6°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> (577.6)	64.46 64.73	5.41 4.83	2.42 2.42	
L-Tyr(Z)-ONb	30 (CCl <sub>4</sub> )	37.8	175—175.5°	+19.1°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> (622.6)	59.80 59.91	4.86 5.10	4.50 4.43	
D,L-Lys(Z)-OBzl	40 (CCl <sub>4</sub> )	43.4	110—111°	—	—	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> (542.6)	61.97 62.20	6.32 6.33	5.16 5.14	5.91 5.93

Tab. 4<sup>6)</sup>. Dargestellte, noch nicht beschriebene Aminosäureester-hydrochloride

Hydrochlorid von	Ausb. (%) Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$	<i>c</i>	Summenformel (Mol.-Gew.)	Ber. Gef. C	Analyse H N Cl
L-Glu(ONb)-ONb	98 131–132°	+10.9°	1.5 (DMF)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> Cl (453.8)	50.28 50.21	4.44 4.40 9.26 9.35
L-Asp(ONb)-ONb	98.7 184–185°	–10.9°	2.0 (Pyridin)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> Cl (439.8)	49.16 48.92	4.13 4.49 9.55 8.06 9.50 8.19
L-Cys(Bzl)-ONb	96 170–171°	–21.4° –13.2°	2.0 (Methanol) 2.0 (Pyridin)	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> SCl (382.8)	53.29 53.35	5.00 5.04 7.31 7.41
L-Tyr(Z)-OBzl	96.4 195–196°	+13.6°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub> Cl (441.9)	65.23 64.90	5.47 5.63 3.17 3.38
L-Tyr(Z)-ONb	86.2 192–194°	+18.8°	2.0 (Pyridin)	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Cl (486.9)	59.20 59.29	4.76 4.99 5.75 6.06
L-His(Bzl)-ONb	89.8 188–190°	–12.5°	2.0 (Pyridin)	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> (453.3)	52.99 53.04	4.89 5.19 12.36 15.64 12.51 16.06
Dl-Lys(Z)-OBzl	79 138–139°	–	–	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cl (406.9)	61.99 62.26	6.68 6.86 6.88 6.79

*N*-Benzoyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure-bis-*[p*-nitro-benzylester]: Ausb. 97%, Schmp. 88 bis 89° aus Äthanol,  $[\alpha]_D^{20}$ : –12.4° (*c* = 1.0, in Äthanol).

C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> (551.5) Ber. C 58.80 H 4.57 N 7.62 Gef. C 58.79 H 4.99 N 7.74

*N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*L*-phenylalanin-*[p*-nitro-phenylester]: 315 mg (1.01 mMol) *N*-CO-*L*-Phe-ONp, 0.2 ccm (2.13 mMol) *tert*-Butylalkohol, 0.05 ccm (0.58 mMol) Pyridin und 3 ccm Benzol werden 2 Std. unter Rückfluß gekocht. Unter Petroläther trat nach Kühlung Kristallisation ein. Ausb. 260 mg (67%), Schmp. 123–126° aus Isopropylalkohol/Petroläther,  $[\alpha]_D^{25}$ : –4.7° (*c* = 0.58, in Chloroform).

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (386.4) Ber. C 62.17 H 5.74 N 7.25 Gef. C 61.77 H 5.43 N 7.57

5. *Anderson-Callahan-Test*<sup>9)</sup>: 0.01–0.02 Mol *N*-Benzoyloxycarbonyl-glycyl-*L*-phenylalanin (Schmp. 127.5–128°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +39.8°, *c* = 5.0, in Äthanol)<sup>9,15,16)</sup> werden mit Katalysator, Lösungsmittel (ca. 10–20 ccm) und der äquimolaren Menge *Isocyanatoessigsäure-äthylester*<sup>17)</sup> versetzt und den entsprechenden Reaktionsbedingungen (s. Tab. 2) unterworfen. Anschließend wird i. Vak. eingedampft und das Reaktionsprodukt in Äthylacetat aufgenommen. Nacheinander extrahiert man mit 5-proz. KHCO<sub>3</sub>-Lösung, 0.1 *n* HCl und gesätt. NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Dabei kann es gelegentlich zur Kristallisation des Peptides kommen, deshalb wäscht man beim Filtrieren gründlich mit absol. Äthanol nach. Während des Eindampfens i. Vak. setzt bei einigen Ansätzen bereits Kristallisation ein, die durch Zugabe von Petroläther vervollständigt wird. Das Rohprodukt wird aus einer 2-proz. äthanol. Lösung fraktioniert kristallisiert. Zuerst fällt das *Racemat* (Schmp. 131 bis 132°) aus. Nach mehrmaligem Einengen der Lösung und zum Schluß durch Fällung mit Äther erhält man den *optisch reinen Tripeptidester* (Schmp. 116–118°). Die angegebenen Ausbeuten (Tab. 2) beziehen sich auf das zur Kristallisation eingesetzte Rohprodukt.

Die vereinigten Waschwässer werden angesäuert. Das sich bildende farblose Öl kristallisiert nach kurzer Zeit, wird abgesaugt und aus Äthylacetat/Äther umkristallisiert. Nach Schmp. (161–162°) und Misch-Schmp. liegt hier das *Benzoyloxycarbonyl-glycyl-DL-phenylalanin* vor.

15) K. Hofmann und M. Bergmann, J. biol. Chemistry **134**, 225 (1940).

16) D. W. Clayton, J. A. Farrington, G. W. Kenner und J. M. Turner, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1398.

17) W. Siefken, Liebigs Ann. Chem. **562**, 75 (1949).

[186/67]