

Renate Grube und Hartmut Niedrich

Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden, X¹⁾

Synthese eines Eleldoisin-Heterooctapeptides mit L- α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure (NHPhe) statt Phenylalanin

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1115 Berlin-Buch

(Eingegangen am 24. April 1967)

Nach weiteren Untersuchungen über Derivate, besonders aktivierter Ester, und Peptide von NHPhe wurde ausgehend vom C-terminalen Tetrapeptid **5** mit Hilfe des Boc-NHPhe-hydroxysuccinimidesters (**2c**) das [5-Asparagin, 7-L- α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure]Eleldoisin-(4-11)-Octapeptid (als Bis-trifluoracetat **9b**) nach der Nitrophenylester-Methode aufgebaut.

In der vorstehenden Mitteilung wurde im Eleldoisin-(4-11)-Octapeptid Glycin durch Hydrazinoessigsäure ersetzt, d. h. die monotone Struktur der Polyamidkette durch eine Hydrazidbindung unterbrochen. Die Synthese weiterer „Heterologer“ hat die Untersuchung der Abhängigkeit der biologischen Wirkung von der Position dieser Unterbrechung im Peptidrückgrat zum Ziel. Aus diesem Grunde wurde, fortschreitend in Richtung auf den nach Lübke²⁾ für die Wirkung weniger essentiellen N-terminalen Bereich, eine weitere Amidbindung alteriert und das Lys-Asp(NH₂)-Ala-NHPhe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ (**9**) synthetisiert. Die an DL-NHPhe-Peptiden gemachten Erfahrungen³⁾ ließen sich dabei ohne Einschränkungen auf L-NHPhe⁴⁾ übertragen. Der gegenüber I. c.¹⁾ unterschiedliche Syntheseweg ergab sich aus dem Verhalten der NHPhe-Peptide, speziell aus ihrer verminderten N α -Acylierbarkeit. Bei N α -ungeschützten NHPhe-Peptiden ist deshalb der ausschließliche Einsatz von aktivierten Estern ratsam³⁾.

I. Weitere Derivate und Peptide von DL- und L-NHPhe

Darüber hinaus waren weitere Untersuchungen über NHPhe-Derivate nötig. Z-NHPhe-OH enthält nach der üblichen Aufarbeitung, ähnlich wie Wunsch⁵⁾ für Z-Phe berichtet, Z-NHPhe-Natriumsalz. Na⁺ ist erst nach Behandlung mit einem HCl-Überschuß zu entfernen. Dabei konnte auch N α .N β -Bis-benzyloxycarbonyl-NHPhe-OH isoliert werden, das sich jedoch schon beim Umkristallisieren aus Methanol teilweise zersetzt. Aus dem so gewonnenen Z-NHPhe war Z-NHPhe-ONSu³⁾ nunmehr in 73proz. Ausbeute erhältlich.

¹⁾ IX. Mittel.: H. Niedrich, Chem. Ber. 100, 3273 (1967), vorstehend. Abkürzungen siehe dort, weitere: NHPhe = α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure, ONSu = N-Hydroxy-succinimidester.

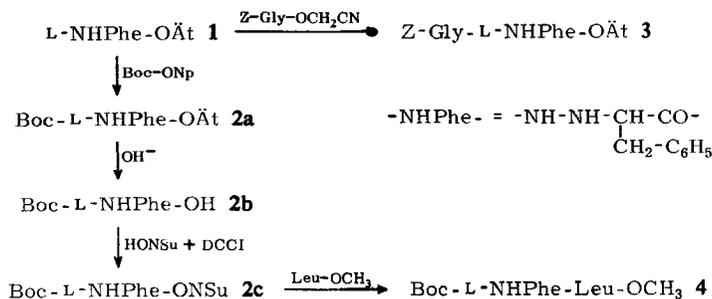
²⁾ K. Lübke, R. Hempel und E. Schröder, Experientia [Basel] 21, 84 (1965).

³⁾ R. Grube und H. Niedrich, Chem. Ber. 99, 3914 (1966).

⁴⁾ H. Niedrich und R. Grube, J. prakt. Chem. 27, 108 (1965).

⁵⁾ W. Grassmann und E. Wunsch, Chem. Ber. 91, 462 (1958).

Ausgehend von Z-NHPhe-ONSu und von Z-NHPhe (mittels DCCI), wurde Z-NHPhe-Gly-Gly-OÄt dargestellt, ein Modellfall für die Anknüpfung von Z-NHPhe an Peptidester. Da eine Entfernung der Z-Schutzgruppe von Hydrazinopeptiden auch nach der für Methioninpeptide erarbeiteten Variante von *Medzihradzky-Schweiger*⁶⁾ nicht gelingt¹⁾, wurde ausschließlich mit der Boc-Schutzgruppe weitergearbeitet. Wir stellten Boc-DL-NHPhe-[*p*-Nitro-phenylester] und -[2.4.5-Trichlor-phenylester] in 43 bzw. 50proz. Ausbeute mittels DCCI⁷⁾ her, jedoch erwies sich der Boc-NHPhe-[*N*-Hydroxy-succinimidester] (**2c**) wegen seiner besseren Kristallisationseigenschaften als vorteilhafter. Ausgehend von L-NHPhe-OÄt·HCl⁸⁾ wurden folgende Synthesen ausgeführt:



II. Synthese des Heterooctaepetides

Ile-Gly-Leu-Met-NH₂^{1,9)} (**5**) wurde zunächst mit **2c** umgesetzt und die Boc-Schutzgruppe mit HCl in Eisessig abgespalten. Überraschenderweise gelang die Boc-Entfernung mit TFA hier nicht vollständig. Das Heteropentapeptid **6b** mit freier Hydrazinogruppe und Boc-Asp(NH₂)-Ala-ONp (**7**), das nach der Anhydrid-Methode unter Verwendung von Pivaloylchlorid nach *Zaoral*¹⁰⁾ erhalten wurde, ergaben 90% Hydrazino-heptapeptid **8**.

Behandlung mit TFA, Umsetzung mit Boc-Lys(Boc)-ONp¹¹⁾ und Entfernen der Schutzgruppen lieferten das Heterooctaepetid-bis-trifluoracetat **9b** in elektrophoretisch und chromatographisch einheitlicher Form, so daß eine weitere Reinigung nicht nötig war. Die Aminosäurezusammensetzung stimmte mit der erwarteten überein und der Abbau mit Leucin-Aminopeptidase¹²⁾ gab keine Anhaltspunkte für eine Racemisierung im Bereich Lys-Asp-Ala-NHPhe. Die biologische Wirkung, zunächst am Meerschweinchenileum bestimmt, betrug ca. 1% der des Eledoisin-(4-11)-Octapeptides (vgl. I. c.¹⁾).

6) H. *Medzihradzky-Schweiger* und K. *Medzihradzky*, Acta chem. Acad. Sci. Hung. **50**, 339 (1966).

7) M. *Bodanszky* und V. *du Vigneaud*, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

8) A. *Darapsky*, J. prakt. Chem. **96**, 251 (1917).

9) K. *Lübke*, E. *Schröder*, R. *Schmiechen* und H. *Gibian*, Liebigs Ann. Chem. **679**, 195 (1964).

10) M. *Zaoral*, Collect. czechoslov. chem. Commun. **27**, 107 (1962).

11) E. *Sandrin* und R. A. *Boissonnas*, Helv. chim. Acta **46**, 1637 (1963).

12) Frau A. *Wergin* sei für die Durchführung des LAP-Abbaus gedankt.

N^β-Benzyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-[*N*-hydroxy-succinimidester] (vgl. auch l. c.³⁾): Zu 1.57 g (5 mMol) *Z*-NHPhe in 12 ccm DMF werden 0.65 g *N*-Hydroxy-succinimid und bei 0° unter kräftigem Rühren 1.13 g *DCCI* hinzugefügt. Nach 20 Stdn. Aufbewahrungszeit bei 0° und 4 Stdn. bei Raumtemperatur wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat i. Vak. bei 55° eingengt. Der Rückstand wird mit *n*-Heptan verrieben, dieses dekantiert, dann wird mit wenig Äther überschichtet und tropfenweise mit Methanol versetzt. Bei -15° kristallisieren 1.5 g (73%), Schmp. 127° (aus Methanol).

N^β-Benzyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-glycyl-glycin-äthylester

a) *DCCI-Methode*: 1.2 g (5 mMol) *Gly-Gly-OÄt·HBr* (hergestellt analog Tos-Gly-Gly-OÄt¹⁴) aus *Z-Gly-OCH₂CN*, *Gly-OÄt* und *HBr*/Eisessig (87%), Schmp. 183—185° werden in 5.2 ccm DMF mit 5 mMol *Triäthylamin* behandelt, das ausgefallene Triäthylamin-hydrobromid abgesaugt, mit 1 ccm DMF gewaschen und das Filtrat mit einer Lösung von 1.72 g (5 mMol) *Z-DL-NHPhe* in 14.5 ccm DMF vereinigt. Nach Zusatz von 1.13 g *DCCI* bei 0° und 1 Stde. Rühren wird die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur belassen, dann der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das DMF abdestilliert. Der Rückstand wird wie üblich aufgearbeitet. Das verbleibende Rohprodukt überläßt man bei -15° der Kristallisation aus Äthanol: 0.9 g (40%), Schmp. 103—105°.

b) *N-Hydroxy-succinimidester-Methode*: Die getrennt bereiteten Lösungen von 1.37 g (3 mMol) *Z-DL-NHPhe-ONSu* und von 3 mMol *Gly-Gly-OÄt* (wie bei a) gewonnen) in insgesamt 10 ccm DMF werden 60 Stdn. bei Raumtemperatur belassen, auf 1/4 des Vol. eingengt und mit Wasser versetzt. Dabei fällt das *Peptid* zunächst ölig aus, wird aber beim Verreiben mit frischem Wasser kristallin. Ausb. 1.04 g (70%), Schmp. 103—105° (aus Äthanol).

$C_{23}H_{28}N_4O_6$ (456.5) Ber. C 60.51 H 6.18 N 12.28 Gef. C 60.47 H 6.43 N 12.36

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-[*p*-nitro-phenylester]: 1.40 g (5 mMol) *Boc-DL-NHPhe* werden unter gelindem Erwärmen in 10 ccm DMF gelöst. Zu der abgekühlten Lösung gibt man 0.792 g (6 mMol) *p*-Nitro-phenol und bei 0° unter Rühren 1.13 g *DCCI*. Nach 7 Stdn. bei Raumtemperatur wird der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingengt und mit Wasser versetzt. Der sich ausscheidende Sirup wird nach Dekantieren des Überstandes getrocknet und mit reichlich *n*-Hexan, auch unter gelindem Erwärmen, verrieben. Die halbste Substanz wird mit Äther versetzt, wobei 0.75 g kristallines Produkt verbleiben. Weitere 0.1 g kristallisieren bei -15° aus dem Ätherfiltrat. Die Rohsubstanz (0.85 g = 43%) wird bei Raumtemperatur in THF gelöst, über Aktivkohle filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der kristalline Rückstand schmilzt aus Äthanol bei 154—155°.

$C_{20}H_{23}N_3O_6$ (401.4) Ber. C 59.84 H 5.78 N 10.47 Gef. C 59.95 H 5.82 N 10.39

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-[2.4.5-trichlor-phenylester]: Wie vorstehend mit 1.18 g (6 mMol) *2.4.5-Trichlor-phenol*. Der nach dem Abdestillieren des DMF erhaltene feste Rückstand wird mit Äther digeriert und abgesaugt (0.49 g). Das Ätherfiltrat wird zur Trockne eingengt und das halbste Produkt mit Petroläther festge-rieben (0.65 g). Rohausb. 1.14 g (50%), Schmp. 144—145° (aus Methanol).

$C_{20}H_{21}Cl_3N_2O_4$ (459.8) Ber. C 52.25 H 4.60 N 6.09 Gef. C 52.10 H 4.83 N 6.32

Die L-NHPhe-Derivate werden analog den DL-NHPhe-Derivaten³⁾ hergestellt:

¹⁴⁾ R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel und M. P. Sieber, Helv. chim. Acta 39, 872 (1956).

Verbindung	Analyse		% Ausb.	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$
	Ber.	Gef.			
L-NHPhe-OÄt·HCl (entspr. 1)			ca. 100	Sirup	+5.3° (c = 2, DMF)
Boc-L-NHPhe-OÄt (2a)			ca. 100	Sirup	-2.9° (c = 2, DMF)
Boc-L-NHPhe-OH (2b)	C 59.98 H 7.19 N 10.00	C 59.91 H 7.25 N 10.07	64 (roh) 44 (aus Äthanol)	185-186°	+21.0° (c = 1, DMF)
Boc-L-NHPhe-ONSu (2c)	C 57.29 H 6.14 N 11.13	C 57.11 H 6.33 N 11.22	60	145-146°	-24.5° (c = 1, DMF)
Z-Gly-L-NHPhe-OÄt (3)	C 63.14 H 6.31 N 10.52	C 63.12 H 6.24 N 10.52	68	58-60°	-15.2° (c = 1, Essig- ester)
Boc-L-NHPhe-L-Leu-OCH ₃ (4)	C 61.89 H 8.16 N 10.32	C 61.90 H 8.39 N 10.40	92 (roh) 77 (aus Äther)	122-124°	-59.1° (c = 1, Äthanol)

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-L-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (6a): Aus 1.56 g (3 mMol) *Ile-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl*^{1,9)} in 9 ccm DMF wird unter Eiskühlung und Röhren mit 0.303 g (3 mMol) *Triäthylamin* das Tetrapeptid freigesetzt, das ausgefallene Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt und mit 3 ccm DMF gewaschen. In den vereinigten Filtraten werden 1.28 g (3 mMol) *Boc-L-NHPhe-ONSu* (2c) gelöst und 60 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird ein Teil des DMF i. Vak. abdestilliert und das *Heteropeptid* 6a mit Wasser ausgefällt: 2.1 g (92%), Schmp. 208-212°, $[\alpha]_D^{25}$: -23.0° (c = 1, in DMF).

C₃₃H₅₅N₇O₇S (693.9) Ber. C 57.12 H 7.99 N 14.13 Gef. C 56.97 H 8.03 N 14.12

tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-alanin-[*p*-nitro-phenylester] (7): 1.16 g *Boc-Asp(NH₂)* (5 mMol) werden in 7 ccm CHCl₃ unter Zusatz von 0.7 ccm *N*-Äthyl-piperidin und 0.4 ccm Pyridin in Lösung gebracht. Danach wird auf -10° gekühlt und unter kräftigem Röhren schnell mit 0.6 g *Pivaloylchlorid* in 1 ccm CHCl₃ versetzt, wobei die Temperatur +10° nicht übersteigen darf. Man hält 5 Min. zwischen +5 und +10° und gibt bei -20° 1.45 g frisch bereitetes *Ala-ONp·HBr* (bereitet aus *Z-Ala-ONp* mit *HBr*/Eisessig, Schmp. 169-171°) in die Lösung, das dann durch Zusatz von 0.7 ccm *N*-Äthyl-piperidin unter kräftigem Röhren freigesetzt und mit dem gemischten Anhydrid zur Reaktion gebracht wird. Dabei fällt das *Boc-Asp(NH₂)-Ala-ONp* als Gel aus. Das Chloroform wird zwischen +50° und +60° i. Vak. abdestilliert und der feste Rückstand zweimal mit 5proz. Citronensäure, mit KHCO₃-Lösung, dann mehrmals mit Wasser im Mörser verrieben und über P₂O₅ i. Vak. getrocknet. Ausb. 1.33 g (63%), Schmp. 212-215° (aus Nitromethan), $[\alpha]_D^{25}$: -23.0° (c = 1, in DMF).

C₁₈H₂₄N₄O₈ (424.4) Ber. C 50.94 H 5.70 N 13.20 Gef. C 50.92 H 5.94 N 13.24

tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-isoleucyl-L-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (8a)

1.73 g (2.5 mMol) 6a in 10 ccm Eisessig werden unter Wasserkühlung ca. 45 Min. mit *Chlorwasserstoff* gesättigt. Danach wird mit absol. Äther das *Heteropeptid-hydrochlorid* (6b·HCl) ausgefällt und mit frischem absol. Äther kristallin gerieben. Ausb. 1.55 g (96%), Schmp. 144-147°, elektrophoretisch einheitlich.

Ohne weitere Reinigung werden zu 1.51 g (2.4 mMol) 6b·HCl in 17.5 ccm DMF, 0.245 g (2.4 mMol) *Triäthylamin* getropft, dem Filtrat (nach Absaugen des Triäthylamin-hydrochlorids) 1.01 g (2.4 mMol) 7 zugesetzt und 60 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Bei

Zugabe von 25 ccm Essigester zu der auf 10 ccm i. Vak. eingeeengten Reaktionslösung fallen 1.93 g (90%) **8a** aus. Nach Umfällen aus DMF/Äther Schmp. 225–227°, $[\alpha]_D^{25}$: -42.5° ($c = 1$, in DMF).

$C_{40}H_{66}N_{10}O_{10}S$ Ber. C 54.65 H 7.57 N 15.93 Gef. C 54.91 H 7.89 N 15.88

N^α.N^β-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (9a): Durch 30 Min. Behandeln von 1.63 g (2 mMol) **8a** mit 3 ccm TFA bei 40° spaltet man die Boc-Gruppe ab und fällt das *Heteroheptapeptid 8b* mit absol. Äther als *Trifluoacetat* aus. Ausb. 1.6 g (ca. 97%), elektro-phoretisch einheitlich.

1.6 g **8b** (Trifluoacetat), 0.184 g *Triäthylamin*, 0.84 g *Boc-Lys(BOC)-ONp*¹¹⁾ (je 1.8 mMol) und 1 Tropfen Eisessig läßt man in 22 ccm DMF 70 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und fällt durch Zusatz von Äther 1.93 g (97%) **9a** aus, das durch Umfällen aus DMF mit Äther gereinigt wird. Schmp. 244–246°, $[\alpha]_D^{25}$: -31.3° ($c = 1$, in DMF).

$C_{51}H_{86}N_{12}O_{13}S$ (1107.4) Ber. C 55.31 H 7.83 N 15.18 Gef. C 55.34 H 8.03 N 15.13

[5-Asparagin, 7-L-α-Hydrazino-β-phenyl-propionsäure]Eledoisin-(4-11)-Octapeptid(Bis-trifluoacetat) (9b): Aus 1.2 g **9a** werden durch 30 Min. Einwirkung von 4 ccm TFA und Ausfällen mit Äther 1.2 g (95%) **9b** als *Bis-trifluoacetat* erhalten. Schmp. 138–148°.

9b erwies sich bei der Papierelektrophorese und der Dünnschichtchromatographie als einheitlich. Nach 48stdg. Hydrolyse mit 6*n* HCl bei 110° ergab die Aminosäureanalyse: Asp 1.06; Gly 1.11; Ala 1.05; Met 0.91; Ile 1.0; Leu 0.95; Lys 0.91; NH₃ 2.9 und Phe 0.12. Phe entsteht bei der Hydrolyse von NHPhe ebenso wie Gly aus NHGly¹⁾.

[183/67]