

## Über die *N*-Trityl- und *N*-*o*-Nitrophenylsulfenylmethode zur Peptidsynthese

LEONIDAS ZERVAS

Organisch-chemisches Laboratorium der Universität Athen

(Z. Naturforsch. **25** b, 322—323 [1970]; eingegangen am 2. Januar 1970)

In der kürzlich in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit von ZAHN et al.<sup>1</sup> wurden gewisse synthetische Peptidmethoden unseres Laboratoriums, die Trityl-<sup>2,3</sup> und die *o*-Nitrophenylsulfenyl-Methode<sup>4</sup> sowie die Bereitung nach diesen Methoden wichtiger Zwischenprodukte der Peptidsynthese, kritisch behandelt. Hierzu möchten wir folgendes bemerken:

### 1. Tritylmethode (*Trityl-L*-valin und *Trityl-valyl*peptide)

a) Die Behauptung von ZAHN et al.<sup>1</sup>, daß „die *N*-Tritylierung von *L*-Valin nach Literaturangaben<sup>3</sup> (in Gegenwart von Diäthylamin) stets zu DL-Derivaten führte und das *L*-Derivat dann nur erhalten wurde, wenn die Hälfte der in der Literatur<sup>3</sup> genannten Basenmenge benutzt wurde“, steht im Widerspruch zu den experimentellen Tatsachen. Im Laufe der Jahre haben wir bestimmt mehr als hundertmal *L*-Valin nach dieser Methode<sup>3</sup> direkt trityliert und stets reines, optisch aktives, *N*-Trityl-*L*-valin in Form seines Diäthylammoniumsalzes erhalten. Die Ausbeute erscheint zwar gering (20 bis 25%), ist aber in Wirklichkeit viel größer, da das nicht umgesetzte *L*-Valin sehr leicht zurückgewonnen werden kann<sup>3</sup>. Entritylierung<sup>2</sup> der auf diese Weise gewonnenen Präparate durch Erwärmen mit 50-proz. Essigsäure lieferte stets in über 90% Ausbeute reines *L*-Valin. Die Angaben von ZAHN et al.<sup>1</sup> über die Bereitung des Trityl-*L*-valins werden von diesen Autoren experimentell nicht belegt und sind nur in allgemeiner Form gehalten, so daß ihre experimentelle Nachprüfung sehr erschwert ist. Immerhin haben wir festgestellt, daß bei Beibehaltung unserer Methode<sup>3</sup> aber mit Zusatz der Hälfte der von uns angegebenen Basenmenge, wie ZAHN et al.<sup>1</sup> empfehlen, die Ausbeute etwas weniger als auf die Hälfte sinkt.

Trityl-aminosäuren bereitet man ferner, und zwar in guter Ausbeute, durch selektive katalytische (Pd) Hydrierung der entsprechenden, leicht zugänglichen, *N*-Trityl-aminosäure-benzylester<sup>3</sup> in geeigneten Lösungsmitteln, z. B. Äthylacetat. Dabei wird die *O*-Benzylgruppe rasch abhydriert, während die parallel verlaufende Abhydrierung der *N*-Tritylgruppe sehr langsam vor sich

geht. Die Anwendung dieser Methode auf *L*-Valin<sup>5</sup> ergab gute Ausbeuten an Trityl-*L*-valin, das auch in diesem Fall in Form seines Diäthylammoniumsalzes isoliert wurde<sup>3</sup>.

b) ZAHN et al.<sup>1</sup> führen an, daß „die Kupplung von Trityl-*L*-valin mit *S*-Trityl-*L*-cysteinyl-*L*-serin-methylester erhebliche Schwierigkeiten brachte und schlecht reproduzierbar war“. Diese, ebenfalls in allgemeiner Form, ohne Angabe von experimentellen Einzelheiten, aufgestellte Behauptung steht gleichfalls im Widerspruch zu den experimentellen Tatsachen. Wir haben diese Kupplung 20–30-mal wiederholt und stets das angegebene Resultat<sup>6</sup> an *N*-Trityl-tripeptidester erzielt. Das hierbei für die Carboxylaktivierung der Tritylamino-säure von uns seit langem, neben dem Dicyclohexylcarbodiimid, empfohlene und auch in diesem Fall verwendete Diphenylphosphorylchlorid<sup>7</sup> braucht nicht frisch bereitet zu sein; entgegen den Angaben von ZAHN et al.<sup>1</sup> ist es ebensogut brauchbar, wenn es einige Jahre im Eisschrank gestanden hat.

Das Tripeptid *L*-Valyl-*S*-trityl-*L*-cysteinyl-*L*-serin-methylester kann ferner mit Hilfe anderer Methoden, z. B. der *o*-Nitrophenylsulfenyl-(oder Carbobenzoxy-)Methode aufgebaut und erst nachträglich nach Abspaltung der Nitrophenylsulfenyl-Gruppe trityliert werden. Dadurch wird der direkte Einsatz von Tritylamino-säure umgangen, ein Verfahren, das seit langem von uns<sup>2,3</sup> und von SCHWYZER und KAPPELER<sup>8</sup> empfohlen und neuerdings von ZAHN et al.<sup>1</sup> mit Erfolg verwendet wurde.

### 2. *o*-Nitrophenylsulfenyl-Methode und *N*-*o*-nitrophenylsulfenyl-*S*-trityl-*L*-cysteinyl-peptide

Die Angaben von ZAHN et al.<sup>1</sup>, daß die Kupplung von *N*-*o*-Nitrophenylsulfenyl-*S*-trityl-*L*-cystein<sup>9</sup> mit *L*-Asparagin-benzylester selten mehr als 10% erbrachte, sind uns unerklärlich. Wir haben eine solche Kupplung, sogar mit dem eine voluminöse Carboxylschutzgruppe enthaltenden *L*-Asparagin-benzhydrylester wiederholt durchgeführt und stets hohe Ausbeute an reinem *N*-*o*-Nitrophenylsulfenyl-*S*-trityl-*L*-cysteinyl-*L*-asparagin-benzhydrylester<sup>10</sup> erhalten. Auch Kupplungen mit anderen Aminosäure- bzw. Peptid-Estern ergaben stets gute Ausbeuten an *N*-*o*-Nitrophenylsulfenyl-*S*-trityl-*L*-cysteinyl-peptiden<sup>6</sup>.

Das Problem der *S*-Entritylierung von Cysteinylpeptiden wird demnächst in einer anderen Arbeit unseres Laboratoriums ausführlich behandelt.

<sup>1</sup> H. ZAHN u. W. DAHNO sowie H. KLOSTERMEYER, H. G. GATTNER u. J. REPIN, Z. Naturforsch. **24** b, 1127 [1969].

<sup>2</sup> L. ZERVAS u. D. M. THEODOROPOULOS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1359 [1956].

<sup>3</sup> G. C. STELAKATOS, D. M. THEODOROPOULOS u. L. ZERVAS, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2884 [1959].

<sup>4</sup> L. ZERVAS, D. BOROVAS u. E. GAZIS, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3660 [1963]; L. ZERVAS u. CH. HAMALIDIS, J. Amer. chem. Soc. **87**, 99 [1965].

<sup>5</sup> Nach Versuchen von Herrn K. SAKARELLOS.

<sup>6</sup> L. ZERVAS, I. PHOTAKI, A. COSMATOS u. D. BOROVAS, J. Amer. chem. Soc. **87**, 4922 [1965].

<sup>7</sup> A. COSMATOS, I. PHOTAKI u. L. ZERVAS, Chem. Ber. **94**, 2644 [1961].

<sup>8</sup> R. SCHWYZER u. H. KAPPELER, Helv. chim. Acta **44**, 1991 [1961].

<sup>9</sup> Bekanntlich ist die Bereitung dieser Substanz sowie im allgemeinen die Nitrophenylsulfenyl-Methode in diesem Laboratorium ausgearbeitet worden. Die anderslautende Angabe von ZAHN et al.<sup>1</sup> (Z. Naturforsch. **24** b, 1127 [1969], Zitat 32) ist wohl auf ein Versehen zurückzuführen.

<sup>10</sup> Nach Versuchen von J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU; Ausb. 72%, Schmp.: 180–181°,  $[\alpha]_D^{25} = -26,3^\circ$  ( $c = 3$ , Dimethylformamid).

## Beschreibung der Versuche

*Trityl-L-valin*: a) Nach der allgemeinen Methode zur direkten Tritylierung von Aminosäuren<sup>3</sup> werden 0,013 Mol Tritylchlorid in etwa 10 Portionen während einer Stde. unter Schütteln zu einem Gemisch von 4 ml Wasser–8 ml Isopropylalkohol zugegeben, das 0,01 Mol L-Valin<sup>11</sup> und 0,03 Mol Diäthylamin enthält. Anschließend wird Wasser zugefügt und das Ganze mit Chloroform extrahiert. Nach Verdampfen des Chloroforms wird der Rückstand kurz mit Alkohol verkocht, wobei evtl. in geringen Mengen gebildeter *N*-Trityl-L-valin-tritylester zu Tritylaminosäure und Trityläther gespalten wird<sup>12</sup>, und anschließend das Ganze zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst, mit etwa 0,5 ml Diäthylamin versetzt und im Eisschrank stehen gelassen, wobei sich das Diäthylammoniumsalz des Trityl-L-valins kristallin abscheidet. Ausbeute 20–25%, Schmp. des Rohproduktes 154–155°,  $[\alpha]_D^{22} = +5,5^\circ$  ( $c=5$ , Methanol)\*.

1,3 g (0,003 Mol) von dem obigen Diäthylammoniumsalz (Rohprodukt) werden mit 5 ml 50-proz. Essigsäure<sup>2</sup> etwa 2–3 Min. auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Nach Zusatz von Wasser wird das abgeschiedene Triphenylcarbinol (0,75 g, Schmp.: 161°) filtriert und das Filtrat zur Trockne verdampft. Das zurückbleibende L-Valin wird mit kaltem abs. Alkohol aufs Filter gebracht und mit Äther gewaschen. Ausb. 0,3 g (93%),  $[\alpha]_D^{23} = +27,2^\circ$  ( $c=3,4$ , 5-*n*. Salzsäure), Lit.<sup>11</sup>  $[\alpha]_D^{24} = +27,7^\circ$ .

b) 3,8 g (0,01 Mol) L-Valin-benzylester *p*-tosylat<sup>13</sup> werden nach der allgemeinen Methode zur Tritylierung von Aminosäure-estern<sup>2, 3</sup> in *N*-Trityl-L-valinbenzylester übergeführt. Das zunächst in sirupöser Form erhältliche Produkt wird in reinem Äthylacetat gelöst und die Lösung in Gegenwart von Pd-Kohle katalytisch

hydriert. Die anfänglich rasche Wasserstoffaufnahme läßt allmählich nach und beträgt etwa nach 45 Min. 275 ml (750 mm Hg, 20°), was etwa 0,011 Mol H<sub>2</sub> entspricht. Die Hydrierung wird in diesem Stadium unterbrochen, die Lösung zur Trockne verdampft und der Rückstand im Äther gelöst. Beim Zugeben von Diäthylamin, etwa 2 ml, und Stehen im Eisschrank werden 2,8 g (65%) Trityl-L-valin-diäthylammoniumsalz erhalten. Schmp.: 155°,  $[\alpha]_D^{20} = +5,5^\circ$  ( $c=5$ , Methanol).

*Trityl-L-valyl-S-trityl-L-cysteinyl-L-serin-methylester*: In der eisgekühlten Lösung von 2,5 g (0,005 Mol) *o*-Nitrophenylsulfenyl-L-valin-dicyclohexylammoniumsalz<sup>4</sup> und 2,5 g *S*-Trityl-L-cysteinyl-L-serin-methylesterhydrochlorid<sup>6</sup> in 20 ml Chloroform werden 1,1 g (0,005 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Nach 24-stdg. Stehen bei gew. Temp. wird der abgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat mit verd. Essigsäure-Wasser-Kaliumhydrogencarbonat gewaschen und anschließend zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in einer Mischung von Tetrahydrofuran und Äther (2:1) gelöst und zu der Lösung 3 ml 2-Mercaptoäthanol und 2,2 ml 4,5-*n*. HCl/Äthylacetat zugegeben. Das nach Zusatz von Äther vollständig sich abscheidende L-Valyl-S-trityl-L-cysteinyl-L-serin-methylesterhydrochlorid (2 g) wird zusammen mit 1 g Tritylchlorid und 1,3 ml Triäthylamin in 7 ml Chloroform gelöst und die Lösung nach etwa 20-stdg. Stehen mit Wasser verd. Essigsäure-Kaliumhydrogencarbonat gewaschen und anschließend scharf zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in trockenem Äther gelöst. Aus der Lösung scheidet sich bald Trityl-tripeptid-methylester. Ausb. 1,3 g, 30% (bezogen auf *o*-Nitrophenylsulfenyl-L-valin), Schmp.: 182° nach Umkristallisieren aus wenig Methanol (Lit.<sup>6</sup>, Schmp. 183–184°).

<sup>11</sup> Präparat Fluka,  $[\alpha]_D^{24} = +27,7^\circ$  ( $c=3,4$ , 5-*n*. Salzsäure); Lit. J. P. GREENSTEIN u. M. WINITZ, *Chemistry of the Amnio Acids*, John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1961,  $[\alpha]_D^{25} = +28,2^\circ$  (in 5-*n*. Salzsäure).

\* Anm. b. d. Korr.: Lit.<sup>3</sup> Schmp. 160°,  $[\alpha]_D +6,7^\circ$  nach dem Umkristallisieren aus Aceton. Der Wert von 6,7° dürfte auf einem Irrtum beruhen, da er bei den unzähligen geprüften Präparaten niemals erreicht wurde.

<sup>12</sup> Erwärmen mit Alkohol war in der ursprünglichen Methode<sup>3</sup> nicht vorgesehen, erwies sich jedoch später auf Grund von Feststellungen in diesem Laboratorium [vgl. G. C. STELAKATOS, A. PAGANOU u. L. ZERVAS, *J. chem. Soc. [London]*, Ser. C **1966**, 1191] als notwendig. Über diese Modifikation haben wir Herrn Prof. Dr. ZAHN bereits vor 3 Jahren schriftlich informiert.

<sup>13</sup> L. ZERVAS, M. WINITZ u. J. P. GREENSTEIN, *J. org. Chemistry* **22**, 1515 [1957].