

Racemisierungsfreie Synthese von Peptiden mittels Säurechloriden

von Emil Taschner, Maciej Smulkowski und Lucja Lubiewska-Nakoneczna

Aus dem Institut für Organische und Lebensmittel-Chemie sowie Technologie der Technischen Hochschule Gdańsk, Polen

Eingegangen am 16. Juni 1970

Die Synthese von Peptiden nach der Methode der gemischten Anhydride verläuft bei Verwendung des Isovaleryl- bzw. Isobutyryl-Rests als Anhydridpartner unter Erhaltung der Konfiguration.

Synthesis of Peptides with Retained Configuration by Means of Some Acid Chlorides

The synthesis of peptides, according to the mixed anhydride method, with isovaleryl or isobutyryl residues as anhydride partner gives peptides with retained configuration.

Bei Untersuchungen über Racemisierungen im Verlauf von Peptid-Synthesen fanden wir, daß die Peptid-Verknüpfung nach der Methode der gemischten Anhydride nur mit 10proz. Racemisierung verläuft, wenn man Anhydride mit Isovaleryl-Rest einsetzt¹⁾. Demgegenüber waren Peptide, die unter denselben Bedingungen (Darstellung des Anhydrids in 30 Min. bei -15° in Anwesenheit von Triäthylamin, 3 stdg. Aminolyse) am gleichen Modell mit Hilfe von Chlorameisensäureäthylester²⁾ synthetisiert wurden, zu 75% racemisiert.

Diese Beobachtung lenkte unsere Aufmerksamkeit auf die erste, später vernachlässigte Methode der gemischten Anhydride, die mit Hilfe von Säurechloriden erhalten wurden³⁾. Der beobachtete niedrige Racemisierungsgrad ließ voraussehen, daß unter entsprechend veränderten Bedingungen nahezu oder völlig optisch einheitliche Peptide erhalten werden können. In diesem Zusammenhang haben wir die Verknüpfung von Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin (Z-Phe-Val) mit L-Phenylalanin-tert.-butylester (H·Phe-OBu^t) untersucht.

1) J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. chem. Soc. **73**, 5553 (1951).

2) Th. Wieland und H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951); R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951); J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. chem. Soc. **74**, 676 (1952).

3) Th. Wieland und R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. **569**, 122 (1950); vgl. auch Ch. Birr, W. Lochinger und Th. Wieland, ebenda **729**, 213 (1969).

Das Peptid Z-Phe-Val wurde mit Isovalerylchlorid bei -15° in Anwesenheit von *N*-Methyl-morpholin⁴⁾ während 60 Sekunden in das gemischte Anhydrid übergeführt und dieses 30 Minuten lang der Aminolyse mit H·Phe-OBu^t unterworfen.

Das in guter Ausbeute erhaltene geschützte Tripeptid wurde von den Schutzgruppen befreit und zum Dipeptid Val-Phe abgebaut⁵⁾, welches aufgrund der papierchromatographischen Prüfung⁶⁾ kein DL-Diastereomeres enthielt.

Danach wurde nun am gleichen Modell unter identischen Bedingungen der Einfluß verschiedener Anhydridpartner auf die Racemisierungstendenz der acylierenden Aminosäure untersucht. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, ergeben gemischte Anhydride mit verzweigten aliphatischen Säure-Resten als Partner der aktivierten Aminosäure nahezu keine Racemisierung, während aromatische Säure-Reste solche verursachen.

Wir prüften an demselben Modell auch das Verhalten der gemischten Anhydride, die aus POCl₃⁷⁾ und aus Benzolsulfonylchlorid⁸⁾ erhalten worden waren. Die Aktivierung der Carboxylgruppe des Z-Dipeptids mit Hilfe von POCl₃ bzw. ArSO₂Cl unter klassischen Bedingungen^{7, 8)} ergab eine Racemisierung von ca. 50 bzw. 28%, während mit *N*-Methyl-morpholin als Base unter obigen Bedingungen der Racemisierungsgrad nur 5 bzw. 7% betrug.

Tabelle 1. Racemisierung bei der Kupplung von Z-Phe-Val-OH mit H·Phe-OBu^t nach der Methode der gemischten Anhydride

Säurechlorid als Anhydridpartner	% Racemisierung bei	
	eigener Synthese	Synthese nach Lit.-Angabe
ClCO ₂ C ₂ H ₅	—	75 ²⁾
(CH ₃) ₂ CH—CH ₂ —COCl	unauffindbar ^{a)}	10 ¹⁾
(CH ₃) ₂ CH—COCl	unauffindbar ^{a)}	—
(CH ₃) ₃ C—COCl	1	—
(C ₂ H ₅) ₂ CH—COCl	1	—
(<i>p</i>)CH ₃ —C ₆ H ₄ —COCl	2	—
(<i>p</i>)Cl—C ₆ H ₄ —COCl	10	—
POCl ₃	5	50 ⁷⁾
C ₆ H ₅ —SO ₂ Cl	7	28 ⁸⁾

a) Weniger als 0.2% Racemisierung.

4) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **89**, 5012 (1967).

5) E. Taschner, Ł. Lubiewska, M. Smulkowski und H. Wojciechowska, Experientia [Basel] **24**, 521 (1968).

6) E. Taschner, A. Chimiak, J. F. Biernat, T. Sokolowska, C. Wasielewski und B. Rzeszotarska, in G. T. Young, Proceedings of the 5th European Peptide Symposium, Oxford 1962, S. 109, Pergamon Press, Oxford 1963; E. Taschner, T. Sokolowska, J. F. Biernat, A. Chimiak, C. Wasielewski und B. Rzeszotarska, Liebigs Ann. Chem. **663**, 197 (1963).

7) Th. Wieland und B. Heinke, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 (1956).

8) T. Sokolowska, G. Kupryszewski und E. Taschner, Roczniki Chem. [Ann. Soc. chim. Polonorum] **32**, 813 (1958); T. Sokolowska, G. Kupryszewski und E. Taschner, Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. **6**, 89 (1958).

Beschreibung der Versuche

Darstellung von Z-Phe-Val-Phe-OBu^t. — *Allgemeine Vorschrift:* Die Lösung von 80 mg (0.2 mMol) *Z-Phe-Val* in 1 ccm trockenem Tetrahydrofuran (THF) wurde bei -15° mit 22 μ l (0.2 mMol) *N-Methyl-morpholin* und darauf unter Rühren mit 0.21 mMol des entsprechenden *Säurechlorids* versetzt. Nach 1 Min. wurden zur gekühlten Lösung 46.4 mg (0.21 mMol) *H-Phe-OBu^t* in 0.8 ccm THF gegeben. Dann hielt man noch 1 Min. bei -15° sowie 30 Min. bei Raumtemperatur, destillierte das THF i. Vak. ab und löste den Rückstand in 6 ccm Essigester. Die organische Phase wurde je 3 mal mit 2 ccm 5proz. NaHCO_3 -Lösung, 2 ccm Wasser, 2 ccm 0.5proz. Salzsäure und mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die Ausbeuten an dem erhaltenen öligen *Z-Phe-Val-Phe-OBu^t* entsprechen denen der konventionellen Methoden.

Edman-Abbau zum Dipeptid: Aus 0.1 mMol rohem *Z-Phe-Val-Phe-OBu^t* wurden die Schutzgruppen nach *Schwyzer*⁹⁾ abgespalten. — 20 mg des so erhaltenen rohen *Tripeptid-hydrochlorids* wurden in 2 ccm Puffer-Lösung (Triäthylamin/2*n* Essigsäure/Wasser = 1:1.68:18.2)¹⁰⁾ vom pH 10 + 2 ccm Aceton gelöst. Man versetzte mit 12 μ l *Phenylisothiocyanat*, ließ bis zum Verschwinden der Ninhydrin-Reaktion bei 30° stehen (einige Stunden), verdampfte das Aceton i. Vak., zog den Rückstand mit Essigester aus und erhielt das rohe *Carbamoyltri-peptid* nach Eindampfen der getrockneten organischen Lösung. Seine Lösung in 0.56 ccm Essigsäure + 0.24 ccm konz. Salzsäure wurde mit 0.8 ccm Wasser versetzt, wobei sofort eine positive Ninhydrin-Reaktion eintrat. Nach 30 min. Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Esterphase enthielt Phenylthiohydantoin-phenylalanin, welches chromatographisch nach *Fraenkel-Conrat*¹¹⁾ identifiziert wurde. Aus der wäßrigen Schicht wurde das *Dipeptid-hydrochlorid* durch Eindampfen i. Vak. gewonnen.

*Ermittlung der optischen Einheitlichkeit*⁶⁾: Wäßrige Lösungen des erhaltenen *Dipeptids* wurden der *Papierchromatographie* (Whatman Nr. 3; Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser = 5:5:1:3; aufsteigend) unterworfen; die Menge an *DL-Diastereomeren* wurde planimetrisch¹²⁾ bestimmt.

9) B. Riniker und R. Schwyzer, *Helv. chim. Acta* **44**, 658 (1961).

10) J. Sjöquist, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **41**, 20 (1920).

11) H. Fraenkel-Conrat, J. I. Harris und A. L. Levy, *Methods biochem. Analysis* **2**, 383 (1955).

12) R. D. Fischer, *Nature* [London] **161**, 764 (1948).