

WOLFGANG GRASSMANN, ERICH WÜNSCH,  
PAUL DEUFEL und ANTON ZWICK<sup>1)</sup>

Beiträge zur Peptidsynthese, IV<sup>2)</sup>

**Darstellung und peptidsynthetische Verwendung von  
O-Benzyl-serin**

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

(Eingegangen am 27. Januar 1958)

Es wird die Synthese von O-Benzyl-DL-serin aus Acrylester beschrieben. Die O-maskierte Aminosäure läßt sich durch katalytische Hydrierung leicht in reines DL-Serin überführen und zur Synthese von Peptiden des Serins verwenden.

Die Synthese von Peptiden der Hydroxyaminosäuren ist neben einigen unwesentlichen Versuchen<sup>3-5)</sup> den letzten 15 Jahren vorbehalten geblieben. 1942 konnten J. S. FRUTON<sup>6)</sup> und wenig später E. L. SMITH und M. BERGMANN<sup>7)</sup> zeigen, daß auch Carbobenzoxy-serin bzw. -hydroxyprolin nach der Azidmethode unter Einhaltung tiefer Temperaturen mit Aminosäureestern zum Carbobenzoxy-peptidester gekuppelt werden können. Serin-peptide sind in der Folgezeit ohne besonderen Schutz der Hydroxylgruppe nach diesem Verfahren<sup>8-13)</sup> sowie nach der gemischten Anhydrid- und Carbodiimidmethode<sup>14,15)</sup> mehrfach dargestellt worden (zur Synthese von Hydroxyprolyl-peptiden siehe E. WÜNSCH<sup>16)</sup>).

Für die Verwendung der Fischerschen Säurechlorid- bzw. der Goldschmidtschen Phosphorazomethode zur Synthese von Peptiden des Typus „Hydroxyaminosäure-X“ war jedoch eine Maskierung der alkoholischen Hydroxylgruppe unerlässlich. Als erste Möglichkeit bot sich die Veresterung zu Acyloxy-aminosäuren<sup>17-20)</sup>, M. FRANKEL

1) P. DEUFEL, Diplomarbeit, Univ. München 1955; A. ZWICK, Diplomarbeit, Univ. München 1956.

2) III. Mittell.: W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. **91**, 462 [1958].

3) E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. **40**, 1501 [1907].

4) M. BERGMANN und A. MIEKELEY, Liebigs Ann. Chem. **458**, 40 [1927].

5) E. ABDERHALDEN und A. BAHN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **234**, 181 [1935].

6) J. biol. Chemistry **146**, 463 [1942]. <sup>7)</sup> J. biol. Chemistry **153**, 627 [1944].

8) D. W. WOOLLEY, J. biol. Chemistry **172**, 71 [1948].

9) J. I. HARRIS und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **191**, 143 [1951].

10) A. STOLL und TH. PETRZILKA, Helv. chim. Acta **35**, 589 [1952].

11) R. F. FISCHER und R. R. WHETSTONE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5076 [1954].

12) H. ADKINS, R. M. ROSS, D. C. SCHROEDER, C. L. MAHONEY und W. W. GILBERT, J. Amer. chem. Soc. **76**, 147 [1954].

13) K. HOFMANN und A. JÖHL, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2914 [1955].

14) J. BADDILEY und A. P. MATHIAS, J. chem. Soc. [London] **1954**, 2803.

15) J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1367 [1956].

16) Dissertat., Univ. München 1955.

17) M. BERGMANN, E. BRAND und F. WEINMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **131**, 1 [1923].

18) M. BERGMANN und A. MIEKELEY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **140**, 128 [1924].

19) R. L. M. SYNGE, Biochem. J. **33**, 1924 [1939].

20) W. SAKAMI und G. TOENNIES, J. biol. Chemistry **144**, 203 [1942].

und M. HALMAN<sup>21)</sup> sowie SHEEHAN und Mitarbb.<sup>15)</sup> haben hiervon bei der Synthese von Poly-*O*-acetyl- und Poly-*O*-carbobenzoxy-serin bzw. *N*-Carbobenzoxy-*O*-acetylseryl-peptiden Gebrauch gemacht.

Als eine weitere Möglichkeit<sup>22)</sup> diskutierte FRUTON<sup>23)</sup> die Verwendung von Benzyläthern. Wir haben diesen Vorschlag aufgegriffen und, da eine direkte *O*-Benzylie rung von Serin nicht gelang, *O*-Benzyl-DL-serin vollsynthetisch in Anlehnung an die von DU VIGNEAUD und Mitarb.<sup>24)</sup> für DL-Serin gegebene Vorschrift hergestellt.

$\alpha,\beta$ -Dibrom-propionsäureester, aus Acrylester und Brom in quantitativer Ausbeute erhältlich, ließ sich mit Natriumbenzylat in Benzylalkohol glatt zum  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -benzyloxy-propionsäureester umsetzen; die Isolierung des Esters stieß jedoch auf größte Schwierigkeiten. Wir haben daher auf eine Reindarstellung verzichtet und das Reaktionsgemisch sofort mit Natronlauge behandelt. Nach Ansäuern konnte die substituierte Propionsäure mit Äther extrahiert werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels lieferte die Aminierung des erhaltenen Rohproduktes mit viel konz. Ammoniak den gewünschten Benzyläther des DL-Serins in 57–62-proz. Ausbeute, bezogen auf Acrylester.

Die Entfernung des *O*-Benzylrestes mittels katalytisch erregten Wasserstoffs (Pd-Schwarz) lieferte chromatographisch reines DL-Serin. Nach M. BERGMANN und L. ZERVAS<sup>25)</sup> konnte *O*-Benzyl-serin mit sehr guter Ausbeute in das Carbobenzoxy-Derivat übergeführt werden; auch die Veresterung mit Chlorwasserstoff/Alkohol verlief glatt. Damit waren alle Voraussetzungen für die Synthese von Serin-peptiden speziell nach der Phosphorazomethode gegeben. Die Versuche konnten mit der Darstellung von *racem*. Seryl-serin abgeschlossen werden.

Auch die Racematspaltung von *O*-Benzyl-DL-serin mit Hilfe des Alkaloidpaares Brucin/Chinin ist uns inzwischen gelungen<sup>26)</sup>; wir werden in Kürze darüber berichten.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE<sup>27)</sup>

1. *O*-Benzyl-DL-serin: Zu 260 g  $\alpha,\beta$ -Dibrom-propionsäure-äthylester (aus Acrylester und Brom in Tetrachlorkohlenstoff in praktisch quantitativer Ausb. erhalten) ließ man unter Rühren bei 0° innerhalb von 2 Stdn. eine Lösung von 23 g Natrium in 500 ccm absol. Benzylalkohol zutropfen. Nach 1 stdg. Weiterführen verseifte man den Ester durch vorsichtige Zugabe von 220 ccm 5 *n* NaOH (Rühren und Eiskühlung). Die Reaktionsmischung wurde noch 1 Stde. bei Raumtemperatur weitergerührt, 1500 ccm Äther zugefügt und nach Durchschütteln die wäßr. Phase abgetrennt; die Ätherlösung wurde noch 4mal mit je 100 ccm Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wäbrig-alkalischen Lösungen wurden unter Kühlung

21) J. chem. Soc. [London] 1952, 2735.

22) Eine 3. Möglichkeit der Hydroxylmaskierung konnten neuerdings SCHWYZER und Mitarbb. mit der Darstellung von *O*-Tetrahydropyranyl-Derivaten der Hydroxyaminosäuren für die Peptidsynthese verwerten. Vgl. B. ISELIN und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta 39, 57 [1956].

23) J. S. FRUTON, Advances Protein Chem., Academic Press Inc., New York 1949, Bd. V, S. 56.

24) J. L. WOOD und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 134, 413 [1940].

25) Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1192 [1932]. 26) Dissertat. G. FÜRST, Univ. München 1957.

27) Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Elementaranalysen wurden im Untersuchungslabor der BASF (Leitung Prof. Dr. B. WURZSCHMITT) ausgeführt.

mit ca. 220 ccm 5 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis zur stark kongosauren Reaktion angesäuert. Das ausgeschiedene Öl nahm man mit 400 ccm Äther auf, extrahierte die wäbr. Phase [noch 2mal mit je 200 ccm Äther und trocknete die vereinigten äther. Lösungen nach Säurefreiwaschen kurz mit Calciumchlorid.

Nach Entfernen des Äthers versetzte man das verbleibende Öl mit 3 *l* konz. Ammoniak, sättigte die fast klare Lösung mit gasförmigem Ammoniak und ließ verschlossen 8–10 Tage stehen. (Zur Erhöhung der Ausbeute ist es vorteilhaft, das Reaktionsgemisch täglich erneut mit Ammoniak zu sättigen.) Die filtrierte Lösung wurde in einer großen Schale zur Trockne gebracht, der Rückstand mit Äther verrührt und abgenutscht. Das getrocknete Gemisch von *O*-Benzyl-serin und Ammoniumbromid wurde in siedendem Wasser gelöst; beim Abkühlen schied sich die Aminosäure in Blättchen vom Schmp. 218° ab. Ausb. 110–121 g (57–62% d. Th.).

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> (195.2) Ber. C 61.50 H 6.7 N 7.17 Gef. C 61.28 H 6.9 N 7.02

2. *DL*-Serin: 19.5 g *O*-Benzyl-serin wurden in 10 ccm *n* HBr + 100 ccm Wasser gelöst und in Gegenwart von 0.5 g Palladiumschwarz in einer offenen Schüttelbirne 4 Stdn. mit Wasserstoff behandelt. Die filtrierte, schwach ammoniakalisch gemachte Lösung dampfte man i. Vak. zur Trockne ein. *DL*-Serin bildet Blättchen vom Schmp. 242° (aus Wasser/Alkohol). Ausb. 0.88 g (86% d. Th.).

3. *N*-Carbobenzoxy-*O*-benzyl-*DL*-serin: 19.5 g *O*-Benzyl-serin, in 50 ccm 2 *n* NaOH gelöst, wurden bei 0° mit 17.1 g Carbobenzoxy-chlorid und 50 ccm 2 *n* NaOH umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung erhält man farbl. Prismen vom Schmp. 102° (aus Essigester/Petroläther). Ausb. 26.2 g (80% d. Th.).

C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> (329.3) Ber. C 65.60 H 5.81 N 4.25 Gef. C 65.48 H 5.76 N 4.25

4. *O*-Benzyl-*DL*-serin-äthylester-hydrochlorid: 20 g *O*-Benzyl-serin wurden in 200 ccm Äthanol suspendiert und Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Nach 10 min. Erhitzen auf dem Wasserbad wurde rasch abgekühlt und i. Vak. zur Trockne gedampft. Nach Wiederholung der Operation ist das Esterhydrochlorid chromatographisch rein. Schmp. 112° (aus Alkohol/Äther). Ausb. 25.6 g (82% d. Th.).

C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>·HCl (259.7) Ber. C 55.49 H 6.99 N 5.39 Gef. C 55.32 H 7.02 N 5.50

5. *N*-Carbobenzoxy-*O*-benzyl-seryl-[*O*-benzyl-serin]-äthylester: Die aus 13 g *O*-Benzyl-serin-äthylester-hydrochlorid und 2.18 ccm Phosphor(III)-chlorid in 250 ccm Pyridin erhaltene Phosphorazolösung wurde mit 17 g *N*-Carbobenzoxy-*O*-benzyl-serin üblich umgesetzt und aufgearbeitet<sup>28)</sup>. Der erhaltene Rückstand wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 86°. Ausb. 24 g (87% d. Th.).

C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (534.6) Ber. C 67.41 H 6.42 N 5.24 Gef. C 67.42 H 6.70 N 5.57

6. *N*-Carbobenzoxy-*O*-benzyl-seryl-[*O*-benzyl-serin]: 13.3 g Carbobenzoxy-dipeptidester nach 5., gelöst in wäbr. Dioxan, wurden innerhalb 30 Min. mit 27 ccm *n* NaOH bei Raumtemp. verseift und aufgearbeitet<sup>28)</sup>. Feine Nadeln aus Essigester/Petroläther. Schmp. 99°. Ausb. 10.3 g (82% d. Th.).

C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (506.6) Ber. C 66.39 H 5.97 N 5.53 Gef. C 66.60 H 6.10 N 5.62

7. Seryl-serin (*Diastereomeren-Gemisch*): Aus 5.1 g Carbobenzoxy-dipeptid nach 6. durch übliche Behandlung mit Wasserstoff in wäbr. Dioxan<sup>28)</sup>. Umkristallisieren aus Wasser/Alkohol. Ausb. 1.65 g (87% d. Th.).

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (192.2) Ber. C 37.41 H 6.29 N 14.58 Gef. C 37.61 H 6.18 N 14.42

<sup>28)</sup> W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, I. Mittel.: Chem. Ber. 91, 449 [1958].

8. *N-Benzoyl-O-benzyl-DL-serin*: 6.55 g *O-Benzyl-serin*, gelöst in 34 ccm *n* NaOH, wurden unter Schütteln bei 0° durch portionsweise Zugabe von 9.5 g *Benzoylchlorid* und 34 ccm 2 *n* NaOH acyliert. Nach Ansäuern wurde der Essigesterextrakt, säurefrei gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde zur Entfernung der Benzoesäure 3mal mit Ligroin ausgekocht und schließlich aus Essigester/Petroläther umkristallisiert: Prismen. Schmp. 159°. Ausb. 7.5 g (73% d. Th.).

$C_{17}H_{17}NO_4$  (299.3) Ber. C 68.21 H 5.73 N 4.68 Gef. C 68.50 H 5.98 N 4.65

9. *N-Benzoyl-DL-serin*: 2.99 g *N-Benzoyl-O-benzyl-serin*, in 100 ccm 80-proz. Methanol gelöst, wurden wie unter 2. hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand kristallisierte aus Essigester/Petroläther. Schmp. 169° (Lit.: 171° korr.<sup>29</sup>); 167–168° unkor.<sup>30</sup>). Ausb. 1.9 g (91% d. Th.).

$C_{10}H_{11}NO_4$  (209.2) Ber. N 6.70 Gef. N 6.84

10. *N-Chloracetyl-O-benzyl-DL-serin*: Aus 19.5 g feingepulvertem *O-Benzyl-serin* in 120ccm *n* NaOH und 34.2 g gepulvertem *Chloressigsäureanhydrid* + 50 ccm 4 *n* NaOH, wie unter 8. beschrieben. Farbl. Öl, das beim Verreiben mit Petroläther alsbald kristallisierte. Nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther und schließlich Wasser: Farbl. Prismen vom Schmp. 158°. Ausb. 18.9 g (69% d. Th.). (Die Acylierung mit Chloracetylchlorid brachte nur 31% Ausb.).

$C_{12}H_{14}ClNO_4$  (271.7) Ber. C 53.04 H 5.19 Cl 13.05 N 5.16  
Gef. C 52.85 H 5.40 Cl 12.89 N 4.92

11. *Glycyl-[O-benzyl-DL-serin]*: 5 g *N-Chloracetyl-O-benzyl-serin* wurden mit 250 ccm konz. *Ammoniak* übergossen und stehengelassen. Der nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Rückstand wurde zur Entfernung von Ammoniumchlorid mit kaltem Wasser behandelt und schließlich aus Wasser/Alkohol umkristallisiert. Schmp. 223°. Ausb. 4.4 g (95% d. Th.).

$C_{12}H_{16}N_2O_4$  (252.3) Ber. C 57.13 H 6.39 N 11.11 Gef. C 57.05 H 6.39 N 11.06

12. *N-Carbobenzoxy-glycyl-[O-benzyl-DL-serin]*: 1.7 g *Glycyl-[O-benzyl-serin]*, in 6.75 ccm *n* NaOH gelöst, wurden mit 10 ccm *n* NaOH und 1.5 g *Carbobenzoxy-chlorid* acyliert. Schmp. 136° (aus Essigester/Petroläther). Ausb. 1.9 g (78% d. Th.).

$C_{20}H_{22}N_2O_6$  (386.4) Ber. C 62.15 H 5.74 N 7.25 Gef. C 61.88 H 5.87 N 7.49

13. *Glycyl-DL-serin*: 1.26 g *Glycyl-[O-benzyl-serin]*, gelöst in 100 ccm heißem Wasser, wurden, wie unter 2. beschrieben, hydriert. Farbl. Blättchen vom Schmp. 202° (Zers.) (aus Wasser/Methanol) (Lit.<sup>31</sup>): 207° korr.). Ausb. 0.71 g (87% d. Th.).

<sup>29</sup>) S. R. L. SÖRENSEN und A. C. ANDERSEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **56**, 297 [1908].

<sup>30</sup>) M. BERGMANN und A. MIEKELEY, Collegium [Darmstadt] **661**, 225 [1925].

<sup>31</sup>) E. FISCHER und H. ROESNER, Liebigs Ann. Chem. **375**, 199 [1910].