

## HORST GNICHTEL und HANS TREPTOW \*)

## Peptidsynthesen mit Porphyrin c

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 5. Februar 1965)

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-L-histidin-cyanmethylester und [*N*<sup>α</sup>,*N*<sup>1m</sup>-Ditrityl-L-histidyl]-glycyl-glycin sowie *N*-Z-Glycin \*\*) und *N*-Z-L-Phenylalanin wurden mit Porphyrin-c-tetramethylester zu den entsprechenden Peptidderivaten umgesetzt. Während die Detritylierung zu den Porphyrin-c-peptidestern führte, trat bei der Abspaltung des Benzyloxycarbonyl-Restes Spaltung der Thioätherbrücke ein.

Zur Synthese von Peptidderivaten des Porphyrins c, dem die Konstitution 2.4.α.α'-Bis-[*S*-L-cystein]-mesoporphyrin-IX zukommt<sup>1,2)</sup>, sind zwei Möglichkeiten gegeben. Die Verknüpfung der Mercaptogruppe von Cysteinpeptiden mit einem geeigneten Derivat des Mesoporphyrins-IX führt zu Peptidderivaten des Porphyrins c, bei denen die Cysteine an beliebiger Stelle in den Peptidketten eingebaut sind. In einer vorangegangenen Arbeit<sup>3)</sup> wurde die Umsetzung von Cysteinpeptiden mit dem Dibromid des Hämatoporphyrins beschrieben. T. L. POPPER und H. TUPPY<sup>4)</sup> berichteten über die Umsetzung von Serum-Albumin mit „reduziertem Protoporphyrin“ zu einem Porphyrin-c-Peptid.

Ein zweiter Weg liegt in der Möglichkeit, mit dem Ester des Porphyrins c (I) eine Peptidsynthese durchzuführen. I ist in bezug auf seine Aminogruppen ein bifunktionaler Aminosäureester. Die Umsetzung mit geeigneten Aminosäure- oder Peptidderivaten führt zu Verbindungen, bei denen die Cysteinreste des Porphyrins c an den Enden zweier Peptidketten stehen. In einer früheren Arbeit<sup>5)</sup> berichteten wir über die Umsetzung von Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden mit I zu hochmolekularen Porphyrin-c-Peptiden.

Zur Darstellung definierter I-Peptide haben wir zunächst *N*-Benzyloxycarbonyl(Z)-glycin und *N*-Z-L-Phenylalanin mit I umgesetzt und 2.4.α.α'-Bis-[*S*-(*N*-Z-glycyl-L-cystein)]-mesoporphyrin-IX-tetramethylester (II) sowie die analoge Verbindung III mit L-Phenylalanin erhalten. Die Synthese wurde sowohl nach der Methode der gemischten Anhydride mit Chlorameisensäure-äthylester<sup>6)</sup> als auch mit Dicyclohexylcarbodiimid<sup>7)</sup> durchgeführt. Die Anhydrid-Methode führte zu doppelt so hohen Ausbeuten wie das Carbodiimid-Verfahren.

\*) Diplomarb. Freie Univ. Berlin 1963.

\*\*\*) Z = Benzyloxycarbonyl-

1) H. THEORELL, *Biochem. Z.* **298**, 242 [1938]; *Enzymologia* [Amsterdam] **6**, 88 [1939].

2) K. ZEILE und H. MEYER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **262**, 178 [1939/40].

3) H. GNICHTEL und W. LAUTSCH, *Chem. Ber.* **98**, 1647 [1965].

4) *Acta chem. scand.* **17**, Suppl. I, 47 [1963].

5) W. LAUTSCH, H. GNICHTEL, I. GNICHTEL und E. HÖFLING, *Kolloid Z.* **141**, 132 [1955].

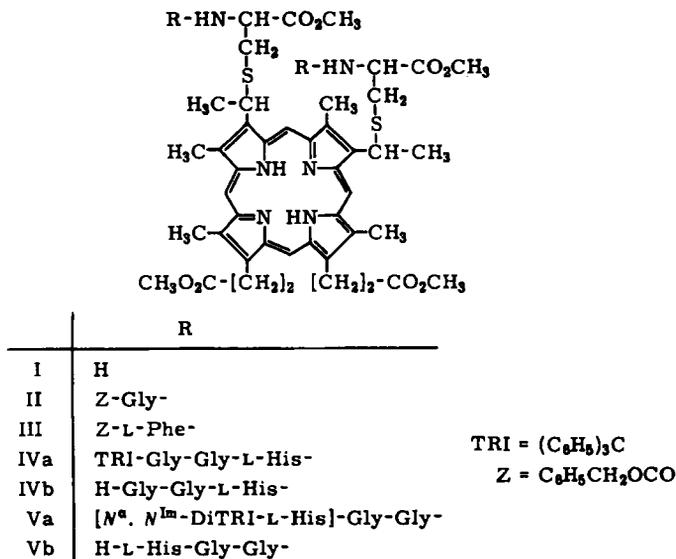
6) R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **34**, 874 [1951].

7) J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 [1955].

Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes durch Verteilung zwischen Äther und Salzsäure führte zu großen Verlusten. Sehr erfolgreich war dagegen die Auftrennung an einer Kieselgel-Säule.

Bei der Abspaltung des Benzyloxycarbonylrestes in Eisessig mit Bromwasserstoff<sup>8)</sup> wurden gleichzeitig die Thioätherbindungen zwischen Cystein und Porphyrin gespalten, so daß Hämatoporphyrin-IX entstand.

Da auch die Hydrierung<sup>9)</sup> und die Umsetzung mit Natrium in flüssigem Ammoniak<sup>10)</sup> sich als ungeeignet erwiesen, benützten wir für weitere Synthesen die Trityl-Schutzgruppe, die sich mit alkoholischer Salzsäure leicht entfernen läßt<sup>11)</sup>.



Die Aminosäure Histidin ist im Cytochrom c als Komplexbildner mit dem Hämeisen von entscheidender Bedeutung<sup>12, 13)</sup>. Wir haben deshalb die Peptidsynthesen mit histidinhaltigen Peptiden ausgeführt, um später die Komplexbildung bei diesen Derivaten zu untersuchen.

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-L-histidin-methylester wurde aus *N*-Trityl-glycyl-glycin-cyanmethylester und L-Histidin-methylester erhalten. Nach alkalischer Verseifung wurde die Säure mit Chloracetonitril in den Cyanmethylester übergeführt.

[*N*<sup>α</sup>. *N*<sup>1m</sup>-Ditrityl-L-histidyl]-glycyl-glycin erhielten wir aus Glycyl-glycin-äthylester und *N*<sup>α</sup>. *N*<sup>1m</sup>-Ditrityl-L-histidin durch Reaktion mit Dicyclohexylcarbodiimid. Durch alkalische Verseifung wurde die Säure erhalten.

8) R. A. BOISSONNAS und G. PREITNER, *Helv. chim. Acta* **36**, 875 [1953].

9) M. BERGMANN und L. ZERVAS, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1192 [1932].

10) H. S. LORING und V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **111**, 385 [1935].

11) A. HILLMANN-ELIES, G. HILLMANN und H. JATZKEWITZ, *Z. Naturforsch.* **8 b**, 445 [1953].

12) K. G. PAUL, *Acta chem. scand.* **5**, 389 [1951].

13) H. TUPPY und G. BODO, *Mh. Chem.* **85**, 807 [1954].

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidin-cyanmethylester setzten wir mit *I*-Tetrahydrochlorid unter Zusatz von Triäthylamin zu 2.4.α.α'-Bis-[*S*-(*N*-trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidyl-*L*-cystein)]-mesoporphyrin-*IX*-tetramethylester (IV a) um. Nach Adsorption an Kieselgel in absol. Benzol und Elution mit Dimethylformamid fiel IV a in 60-proz. Ausbeute an.

Aus [*N*<sup>α</sup>.*N*<sup>1m</sup>-Ditrityl-*L*-histidyl]-glycyl-glycin und *I*-Tetrahydrochlorid erhielten wir in Methylenchlorid mit Dicyclohexylcarbodiimid 63% 2.4.α.α'-Bis-[*S*-(*N*<sup>α</sup>.*N*<sup>1m</sup>-ditrityl-*L*-histidyl-glycyl-glycyl-*L*-cystein)]-mesoporphyrin-*IX*-tetramethylester (Va). Auch hier war die Reinigung durch Säulenchromatographie erfolgreich.

Bei der Verseifung der Ester IV a und Va mit wäßriger Kalilauge und anschließender Detritylierung mit Essigsäure wurden Porphyrine mit anormalem Absorptionsspektrum erhalten. Aus dem Defizit an Stickstoff und Schwefel in den Analysen ergab sich, daß jeweils ein Peptidrest mit dem Cystein an der Thioätherbrücke abgespalten worden war.

Die Detritylierung von IV a und Va mit methanol. Salzsäure verlief dagegen ohne Spaltung, so daß die Porphyrinpeptidester IV b und V b sowie ihre Hydrochloride analysenrein erhalten werden konnten.

Die Verbindungen II–V haben die gleichen Absorptionsspektren wie I und die bereits vorher beschriebenen Porphyrin-*c*-Peptide<sup>3)</sup>.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidin-methylester: Die Mischung von 24.6 g *N*-Trityl-glycyl-glycin-cyanmethylester<sup>14)</sup>, 33.6 ccm Triäthylamin und 21.6 g *L*-Histidin-methylester-dihydrochlorid in 75 ccm Tetrahydrofuran wurde mit 0.2 ccm Eisessig versetzt. Nach 3 Tagen bei Raumtemp. wurden 500 ccm Wasser hinzugegeben, nach einer Stde. abgesaugt und mit Wasser gewaschen (24.5 g). Aus Acetonitril (20 ccm/l g) Ausb. 20 g (64%), Schmp. 193–195°.  $[\alpha]_D^{25}$ : +6.6° (*c* = 2 in Pyridin).

$C_{30}H_{31}N_5O_4$  (525.6) Ber. C 68.55 H 5.94 N 13.33  $1OCH_3$  5.90  
Gef. C 68.81 H 6.33 N 13.77  $OCH_3$  6.35

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidin: 19 g Ester wurden mit 21.6 ccm 10-proz. methanol. Kalilauge versetzt, nach einer Stde. mit 65 ccm Wasser verdünnt und filtriert. Das Methanol zog man i. Vak. ab, fälltte aus der wäßr. Lösung mit 76 ccm 5-proz. Essigsäure das Peptid (18.5 g) und löste das Rohprodukt durch längeres Kochen in Methanol. Das auskristallisierte Produkt war danach nicht mehr in Methanol löslich. Zur Analyse wurde dann aus Äthanol umkristallisiert, worauf die Substanz auch nicht mehr in Äthanol löslich war. Der gleiche Vorgang wurde beim Umkristallisieren aus Benzol beobachtet. Ausb. 10 g (54%), Schmp. 174–176° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ : +8.8° (*c* = 2 in Dimethylformamid).

$C_{29}H_{29}N_5O_4$  (511.6) Ber. N 13.69 Gef. N 13.46

*N*-Trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidin-cyanmethylester: 11.2 g *N*-Trityl-glycyl-glycyl-*L*-histidin, 6.5 ccm Triäthylamin und 5.1 g Chloracetonitril wurden bei 0° zusammengegeben, 24 Stdn. bei Raumtemp. belassen und anschließend 2½ Stdn. auf 40° erwärmt. Nach Zugabe von

<sup>14)</sup> R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL und P. SIEBER, Helv. chim. Acta 39, 881 [1956].

150 ccm Essigester wurde mit Wasser, Citronensäurelösung,  $\text{NaHCO}_3$ - und gesätt.  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i. Vak. eingedampft. Man nahm das Öl in Methanol auf und versetzte mit Petroläther. Zur Analyse wurde dreimal aus Benzol/Petroläther umgefällt. Ausb. 5.5 g (46%) amorphe Substanz.

$\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4$  (550.6) Ber. N 15.26 Gef. N 15.28

[ $N^\alpha, N^{1m}$ -Ditryl-L-histidyl]-glycyl-glycin-äthylester: Zu 1.65 g Glycyl-glycin-äthylester in 20 ccm Methylenchlorid wurden 3 g Dicyclohexylcarbodiimid in 12 ccm Methylenchlorid gegeben, unter Kühlung auf  $-10^\circ$  und kräftigem Rühren 6.4 g  $N^\alpha, N^{1m}$ -Ditryl-L-histidin<sup>15)</sup> eingetragen und über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Der ausgeschiedene Harnstoff (1.8 g = 82%) wurde abfiltriert, 0.5 ccm Eisessig zugesetzt und nach 10 Min. erneut filtriert. Die mit wäbr. Citronensäure,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschene und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknete Lösung wurde i. Vak. eingedampft und das Öl mit Petroläther verrieben (6.4 g). Aus 70 ccm Benzol/Cyclohexan (1:6) Ausb. 5.4 g (74%). Schmp.  $99-101^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-10.4^\circ$  ( $c = 2$  in Chloroform).

$\text{C}_{50}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_4$  (782.0) Ber. C 76.80 H 6.06 Gef. C 76.46 H 6.57

[ $N^\alpha, N^{1m}$ -Ditryl-L-histidyl]-glycyl-glycin: 4.2 g des vorstehenden Esters in 7 ccm Dioxan wurden mit 9 ccm 10-proz. methanol. Kalilauge versetzt, 8 Min. auf  $70-80^\circ$  erwärmt und nach dem Abkühlen mit 30 ccm Wasser versetzt. Unter Kühlung wurde mit 10-proz. Essigsäure bis pH 4 angesäuert, dreimal mit je 100 ccm Chloroform extrahiert, nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  auf 100 ccm konzentriert und 500 ccm Petroläther zugesetzt. Zur Analyse fällte man zweimal aus Chloroform/Petroläther um und kochte zweimal mit Benzol. Ausb. 2.65 g (65%). Schmp.  $212-213^\circ$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-39.0^\circ$  ( $c = 2$  in Dimethylformamid).

$\text{C}_{48}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_4$  (753.9) Ber. C 76.47 H 5.75 N 9.29 Gef. C 76.35 H 5.82 N 9.14

#### Peptidsynthesen mit Porphyrin c (Tab. 1)

**Methode 1, Anhydrid-Verfahren:** 5.0 mMol *N-Z-Aminosäure* in 70 ccm absol. Chloroform wurden mit 0.7 ccm Triäthylamin und bei  $-10^\circ$  mit 0.48 ccm Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Nach  $1/2$ stdg. Stehenlassen bei  $0^\circ$  wurde eine Mischung aus 500 mg *I-Tetrahydrochlorid*<sup>3)</sup> und 3.0 ccm Triäthylamin in 20 ccm absol. Chloroform hinzugegeben, 2 Stdn. gerührt und dann der mit 0.1 *n* HCl und wäbr.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschene Ansatz über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

**Methode 2, Carbodiimid-Verfahren:** 2.0 g *I-Tetrahydrochlorid*, in 40 ccm Methylenchlorid aufgeschlänmt, wurden bei  $0^\circ$  mit 1.12 ccm Triäthylamin versetzt. Nach 15 Min. Schütteln wurden 6.0 mMol *N-Z-Aminosäure* bzw. *N-Trityl-peptid* und 4.12 g Dicyclohexylcarbodiimid in je 20 ccm Methylenchlorid zugesetzt und nach 18 Stdn. bei Raumtemp. der ausgeschiedene Harnstoff abfiltriert. Die mit Wasser gewaschene und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknete Lösung dampfte man i. Vak. ein und digerierte das unumgesetzte Carbodiimid mit Petroläther.

**Methode 3, Cyanmethylester-Verfahren:** Zu 7.5 mMol *N-Trityl-glycyl-glycyl-L-histidin-cyanmethylester* in 12.5 ccm Tetrahydrofuran gab man 2.5 mMol *I-Tetrahydrochlorid*, 2.1 ccm Triäthylamin und 5 Tropfen Eisessig. Nach  $2 1/2$  Tagen wurden 80 ccm Wasser zugesetzt und der Farbstoff in Methylenchlorid aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen und eingedampft.

**Chromatographie der Porphyrinpeptide:** Die Rohprodukte wurden an einer Säule aus „Kieselgel unter 0.08 mm“ (Merck, mit Benzol eingeschlänmt) adsorbiert. II und III wurden in Chloroform gelöst aufgetragen, IVa und Va in Methylenchloridlösung.

<sup>15)</sup> G. AMIARD, R. HEYMÈS und L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France 1955, 191.

Tab. 1. Dargestellte Porphyrin-c-peptid-Derivate

Verb.	Peptidderivat	Methode	Ausb. Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen		Absorptionsmaxima in				
					Ber.	Gef.	Pyridin/Wasser (9:1) $\epsilon \cdot 10^{-3}$	626.5 m $\mu$			
II	Z-Gly-OH	1	58 % <sup>b)</sup>	C <sub>64</sub> H <sub>74</sub> N <sub>8</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (1243.4)	9.01	9.98	130.6	11.60	8.25	6.29	3.62
		2a)	84—86° 30 % <sup>c)</sup>			8.50	9.70	407.0	503.5	538.0	572.0
III	Z-L-Phe-OH	1	30 % <sup>c)</sup>	C <sub>78</sub> H <sub>86</sub> N <sub>8</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (1423.7)	7.87	8.72	156.9	12.77	8.64	6.56	3.80
		2a)	65—67° 13 %			7.57	8.58				
IVa	TRI-Gly-Gly-L-His- OCH <sub>2</sub> CN	3	60 % <sup>d)</sup>	C <sub>102</sub> H <sub>110</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (1848.3)	12.13	6.72	103.7	10.46	7.12	5.55	3.32
			$\approx 300^\circ$ (Zers.)			12.28	6.25				
Va	[N $\alpha$ -Nm-D]TRI-L- His]-Gly-Gly-OH	2	63 % <sup>e)</sup>	C <sub>140</sub> H <sub>138</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (2332.9)	9.61	5.32	105.8	13.20	9.26	7.22	4.58
			164—167°			9.68	5.35				

a) In Tetrahydrofuran.

b) Aus Essigester/Petroläther.

c) Aus Benzol/Petroläther.

d) Aus Chloroform mit dem 12fachen Vol. Äther gefällt.

e) Aus Methylencchlorid/Petroläther (1:7).

Tab. 2. Dargestellte Porphyrin-c-peptid-ester

Dargestellte Verbindung	Ausgangs- Verbindung	Ausb. Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen			Absorptionsmaxima in Pyridin/Wasser (9:1) $\epsilon \cdot 10^{-3}$				
				S	Cl	OCH <sub>3</sub>	407.0	503.5	538.0	572.0	626.5
IVb	IVa	37%	C <sub>64</sub> H <sub>82</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (1363.6)	Ber. 4.70	9.10	9.10	123.6	12.58	8.98	7.02	4.34
		>250°		Gef. 4.33							
IVb-4HCl	IVb	79%	C <sub>64</sub> H <sub>86</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> 4Cl (1509.5)	Ber. 4.25	9.40	8.23	126.6	13.16	9.26	7.40	4.54
		>260°		Gef. 4.17							
Vb	Va	73%	C <sub>64</sub> H <sub>82</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> (1363.6)	Ber. 4.70	9.10	8.53	124.6	12.76	8.68	6.80	4.48
		185–190° (Zers.)		Gef. 4.77							
Vb-4HCl	Vb	78%	C <sub>64</sub> H <sub>86</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> 4Cl (1509.5)	Ber. 4.25	9.40	8.23	131.0	12.34	9.50	7.28	4.62
		188–190° (Zers.)		Gef. 3.95							

Die Chromatogramme wurden mit folgenden Gemischen entwickelt.

- Für II : Essigester/Äthanol 4 : 1  
III : Essigester/Chloroform 1 : 1  
IVa : Dimethylformamid  
Va : Essigester/Aceton 1 : 9

*Detritylierung (Tab. 2):* 0.60 mMol IVa oder Va wurden mit 43.2 ccm *n*/10 methanol. HCl 20 Min. auf 70° erwärmt. Nach Filtrieren wurde mit 180 ccm Äther versetzt, die Fällung abzentrifugiert, mit Äther gewaschen, das rohe Hydrochlorid in 40 ccm Wasser aufgenommen, die Lösung mit 18 ccm 0.2*n* NH<sub>4</sub>OH auf pH 7–8 gebracht und der Ester mit Chloroform extrahiert. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde i. Vak. bei 25° eingedampft, zur Analyse in Chloroform gelöst, in Äther einfiltriert, abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und bei Raumtemp. i. Vak. getrocknet.

*Tetrahydrochloride von IVb und Vb:* 0.50 mMol IVb oder Vb wurden mit 55 ccm *n*/10 methanol. HCl 10 Min. auf 70° erhitzt und die Mischung unter Stickstoff i. Vak. bei 20–25° zur Trockne gebracht. Dann löste man in Methanol, filtrierte in das fünffache Vol. Äther ein und wusch den abzentrifugierten Farbstoff mit Äther. [45/65]