

Erich Wünsch und Angelo Fontana *)

***N*^α-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-*O*-tert.-butyl-hydroxyaminosäuren und deren „aktivierte Ester“**

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

(Eingegangen am 26. Juli 1967)

Die Darstellung von 2-Nitro-phenylsulfenyl-*O*-tert.-butyl-serin, -threonin, -tyrosin und -hydroxyprolin **) aus den freien *O*-maskierten Aminosäuren sowie deren Überführung in „*N*-Hydroxy-succinimid-“, 4-Nitro-phenyl-, 2,4-Dinitro-phenyl- und Pentachlor-phenylester als Ausgangsmaterialien für die Peptidsynthese wird beschrieben.

Für einen erfolgreichen Abschluß unserer Versuche einer Totalsynthese des Glucagons war es unumgänglich geworden, den 2-Nitro-phenylsulfenyl-Rest zur Blockierung der α -Amino-Funktion zu verwenden, da der durch das Auftreten von Methionin im C-terminalen Bereich der Pankreashormon-Sequenz vom synthetischen Standpunkt erforderliche Einsatz zuerst von *N*-Trifluoracetyl- und später von *N*-Phthaloyl-Schutzgruppen in Kombination mit tert.-Butyl-Maskierungen der Hydroxyl- und Carboxyl-Funktionen bzw. mit tert.-Butyloxycarbonyl-Blockierung der *N*^ε-Lysin-Funktion nicht oder nur unzureichend zum Erfolg geführt hatte¹⁾.

Für den Aufbau von zu einer weiteren Verknüpfung geeigneten, nitrophenylsulfenylgeschützten Glucagon-Fragmenten — insbesondere der Sequenzen 16—21 und 7—15 — benötigen wir daher 2-Nitro-phenylsulfenyl-*O*-tert.-butyl-serin bzw. -threonin; diese waren aus den von uns früher beschriebenen freien Hydroxyaminosäure-tert.-butyläthern durch Acylierung mittels 2-Nitro-phenylsulfenylchlorid unter „pH-Stat“-Reaktion bei pH 8 gut zugänglich. Aus bekannten Gründen wurden die Nitrophenylsulfenyl-aminosäuren als stabile, über lange Zeit haltbare Dicyclohexylammoniumsalze isoliert. Auf analoge Weise konnten auch die Derivate von *O*-tert.-Butyltyrosin und -hydroxyprolin gewonnen werden (Tab. 1).

Die erhaltenen Nitrophenylsulfenyl-hydroxyaminosäure-tert.-butyläther ließen sich in befriedigender Ausbeute nach dem Carbodiimid-Verfahren mit *N*-Hydroxy-succinimid, 4-Nitro-phenol, 2,4-Dinitro-phenol oder 2,3,4,5,6-Pentachlor-phenol zu den entsprechenden „aktivierten Estern“ umsetzen. Die dargestellten Verbindungen (siehe Tab. 2) kristallisierten ausnahmslos gut; sie sind speziell für die Verknüpfung mit freien Peptiden in Gegenwart äquimolekularer Mengen tert. Basen hervorragend geeignet. (Siehe dazu die beiden folgenden Abhandlungen.)

*) Gegenwärtige Anschrift: Istituto di Chimica Organica dell' Università, Padova, Italia.

**) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin.

¹⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966); 100, 816 (1967).

Tab. 1. Dargestellte N^α -[2-Nitro-phenylsulfenyl]-*O*-tert.-butyl-hydroxyaminosäuren (Dicyclohexylammoniumsalze)

Aminosäure	Ausb. %	Schmp.	$[\alpha]_{578}^{20}$	c DMF	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse			
						Ber. Gef. C	H	N	S
Serin	91	170–171°	–38.0°	1.1	C ₂₅ H ₄₁ N ₃ O ₅ S (495.7)	60.56 60.18	8.33 8.33	8.48 8.63	6.46 6.66
Threonin	93	179–180°	–44.6°	0.4	C ₂₆ H ₄₃ N ₃ O ₅ S (509.7)	61.55 61.57	8.54 8.36	8.28 8.26	6.39 6.25
Tyrosin	87	156–157°	+27.2° *)	0.7	C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₅ S (571.8)	65.12 65.28	7.93 8.00	7.34 7.30	5.60 5.53
Hydroxyprolin	87	151–152°	–42.4°	1.1	C ₂₇ H ₄₃ N ₃ O ₅ S (521.7)	62.16 62.28	8.30 8.30	8.05 8.02	6.14 6.23

*) $[\alpha]_{578}^{20}$: +24.0°; $[\alpha]_{546}^{20}$: +41.4°.Tab. 2. Dargestellte „aktive“ Ester von NPS-*O*-tert.-Butyl-hydroxyaminosäuren^{a)}

Derivat	Ausb. %	Schmp.	$[\alpha]_{578}^{20}$ c=1 DMF	$[\alpha]_{546}^{20}$ c=1 DMF	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse			
						Ber. Gef. C	H	N	S
NPS-Ser(tBu)-ONP	67.5	82.5–83.5°	–116.0°	–130.8°	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₇ S (435.5)	52.40 52.16	4.86 4.86	9.65 9.25	7.36 7.17
NPS-Ser(tBu)-ODNP	68.5	117–118°	–97.7°	–115.5°	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₉ S (480.3)	47.49 47.70	4.19 4.45	11.66 11.96	6.66 6.68
NPS-Ser(tBu)-OSU ^{b)}	90	152–153.5°	–47.8°	–51.2°	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₇ S (411.4)	49.63 49.25	5.14 5.12	10.22 10.03	7.79 7.90
NPS-Ser(tBu)-OPCP ^{c)}	73	119–120.5°	–47.0°	–52.4°	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₅ N ₂ O ₅ S (562.7)	40.55 40.69	3.22 3.10	4.97 5.00	5.67 5.75
NPS-Thr(tBu)-ONP	68	121–122°	–148.8°	–173.7°	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₇ S (449.5)	53.43 53.47	5.15 5.30	9.36 9.17	7.13 7.23
NPS-Thr(tBu)-ODNP	73	126–127°	–79.6°	–90.8°	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₉ S (494.5)	48.58 48.81	4.48 4.52	11.33 11.30	6.47 6.54
NPS-Thr(tBu)-OSU	91	138–139.5°	–52.9°	–56.9°	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₇ S (425.4)	50.82 50.81	5.45 5.46	9.87 9.70	7.52 7.58
NPS-Thr(tBu)-OPCP ^{d)}	73	130–131.5°	–61.8°	–67.2°	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₅ N ₂ O ₅ S (576.7)	41.64 41.49	3.49 3.29	4.85 4.66	5.55 5.72
NPS-Tyr(tBu)-ONP	65.5	139–140°	–62.2°	–64.3°	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₇ S (511.6)	58.70 58.80	4.92 5.02	8.21 8.03	6.25 6.22

a) Abkürzungen: NPS = 2-Nitro-phenylsulfenyl, ONP = *p*-Nitro-phenylester, ODNP = 2,4-Dinitro-phenylester, OSU = *N*-Hydroxy-succinimidester, OPCP = Pentachlorphenylester.

b) Die Verbindung wurde mit gleichem Schmp. auch von J. Rudinger hergestellt (Privatmittel. d. Autors).

c) Cl Ber. 31.45; Gef. 31.31.

d) Cl Ber. 30.69; Gef. 30.71.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli (Büchi) bestimmt, die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Dünnschichtchromatographie.

1. *Dicyclohexylammonium-Salze von N^α-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-O-tert.-butyl-hydroxyaminosäuren (allgemeine Darstellungsvorschrift)*: Zu 50 mMol *O*-tert.-Butyl-hydroxyaminosäure in 25 ccm Dioxan und 17 ccm 2 *n* NaOH tropft man unter Rühren innerhalb von 30 Min. 55 mMol 2-Nitro-phenylsulfenylchlorid in 25 ccm Dioxan sowie 2 *n* NaOH unter Einhalten von pH 8 zu (Verbrauch ca. 38 ccm 2 *n* NaOH). Die Reaktionsmischung wird 1 Stde. weiter-

gerührt, nach Verdünnen mit 600 ccm Wasser filtriert und nach Zugabe von 200 ccm Essigester vorsichtig bei 0° mit n H₂SO₄ auf pH 3 angesäuert. Die abgetrennte organische Phase wird zweimal mit wenig Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich bei 0° unter Rühren mit 10 ccm *Dicyclohexylamin* in 100 ccm Diäthyläther versetzt. Nach 1 stdg. Stehenlassen im Kühlschrank wird das ausgefallene Produkt*) abfiltriert, sorgfältig mit Diäthyläther gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 87–93% (s. Tab. 1).

2. *Darstellung der aktiven Ester NPS-Ser(tBu)-OR*: 50 mMol *H-Ser(tBu)-OH*· $\frac{1}{4}$ H₂O werden mit *2-Nitro-phenylsulfenylchlorid***), wie unter 1. beschrieben, umgesetzt. Zu der erhaltenen, über Natriumsulfat getrockneten Essigesterlösung des *NPS-O-tert.-Butyl-serins* werden bei 0° unter Rühren 50 mMol *N-Hydroxy-succinimid* (oder *4-Nitro-phenol*, *2,4-Dinitro-phenol* bzw. *Pentachlorphenol*) und 50 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Die Reaktionsmischung wird noch 1 Stde. bei 0° und 3 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, nach kurzzeitigem Abkühlen auf 0° vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 67.5–90% (s. Tab. 2).

3. *2-Nitro-phenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-threonin [NPS-Thr(tBu)-OH]*: 7.0 g (40 mMol) *H-Thr(tBu)-OH* werden mit *2-Nitro-phenylsulfenylchlorid*, wie unter 1. beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Die erhaltene Essigesterlösung wird i. Vak. eingedampft, zum Schluß unter azeotroper Destillation mit Benzol; dabei tritt Kristallisation ein. Das Produkt wird nach Behandeln mit Petroläther abfiltriert, mit dem gleichen Lösungsmittel gut gewaschen und i. Vak. getrocknet. Aus Diäthyläther/Petroläther Schmp. 112–114°; $[\alpha]_D^{20}$: $-93.2 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -95.9° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Ausb. 12.85 g (fast quantitativ).

C₁₄H₂₀N₂O₅S (238.4) Ber. C 51.21 H 6.13 N 8.53 S 9.74

Gef. C 51.26 H 6.07 N 8.46 S 9.74

4. *Darstellung der aktiven Ester NPS-Thr(tBu)-OR*: 25 mMol *NPS-Thr(tBu)-OH* in 150 ccm Essigester werden bei 0° unter Rühren mit 25 mMol *N-Hydroxy-succinimid* (oder *4-Nitro-phenol*, *2,4-Dinitro-phenol* bzw. *Pentachlorphenol*) und 25 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 Stde. bei 0° und 3 Stdn. bei Raumtemp. nachgerührt, nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs die Lösung i. Vak. eingedampft und der erhaltene Rückstand mit Äthanol behandelt***). Hierbei erfolgt zunächst Lösung und anschließend rasche Kristallisation, die durch mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt wird. Ausb. 68–91% (s. Tab. 2).

*) Das Dicyclohexylamin-Salz des Hydroxyprolins fällt erst nach Einengen der Lösung i. Vak. aus.

**) puriss. Qualität, Fluka AG, Buchs SG.

***) *NPS-Thr(tBu)-ONP* wurde aus Diäthyläther/Petroläther umkristallisiert.