

Helmut Zahn und Knut Hammerström

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein und *S*-substituierte Derivate *)**

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

(Eingegangen am 11. September 1968)

Die *S*-substituierten Derivate **1b–i** des *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteins (**1a**) werden aus **1a** bzw. den *S*-geschützten L-Cystein-Derivaten mit freier Aminogruppe dargestellt.

Für die Synthese cystein- und cystinhaltiger Peptide, speziell des Insulins, sahen wir uns gezwungen, neben dem in früheren Arbeiten benutzten Benzylrest¹⁾ weitere Schwefelschutzgruppen zu erproben. Von besonderem Interesse waren dabei die säurelabilen Schutzgruppen. Im folgenden beschreiben wir die Darstellung einer Reihe von Cystein-Derivaten, die bei der Synthese größerer Insulinfragmente eingesetzt wurden²⁾.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein (**1a**) sowie eine Reihe *S*-substituierter Derivate konnten wir erstmals in kristalliner Form darstellen und somit eindeutig charakterisieren. Als Vertreter dieser Verbindungsklasse waren schon *S*-Benzyl-*N*-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein³⁾ und *S*-Benzoyl-*N*-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein⁴⁾ beschrieben. Dagegen konnten *S*-Trityl-*N*-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (**1c**)⁵⁾ und *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein (**1a**)⁴⁾ bisher nur als Öle isoliert werden.

Verbindungen des Typs Boc-Cys(R) (**1**) können grundsätzlich auf zwei Wegen erhalten werden: Entweder man führt in das *S*-substituierte L-Cystein die Aminoschutzgruppe (Weg A) oder umgekehrt in das *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein (**1a**) die Thiolschutzgruppe ein (Weg B). Da die Einführung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe basische Bedingungen verlangt, ist bei Thiolschutzgruppen, die im alkalischen Medium nicht abgespalten werden, Weg A vorzuziehen. Bei alkalilabilen Thiolschutzgruppen geht man dagegen zweckmäßig von **1a** mit freier Thiolgruppe aus (Weg B).

Die Darstellung der thiolgeschützten Cysteinderivate erfolgte mit Ausnahme des *S*-[Tetrahydropyranyl-(2)]-L-cysteins⁶⁾, das nach einer modifizierten Vorschrift

*) 70. Mittel. über Peptide; 69. Mittel.: *T. Okuda* und *H. Zahn*, Makromolekulare Chem., im Druck.

1) *R. H. Sifferd* und *V. du Vigneaud*, *J. biol. Chemistry* **108**, 753 (1935).

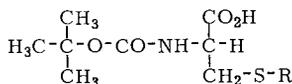
2) Dissertat. *K. Hammerström*, Techn. Hochschule Aachen 1968.

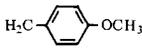
3) *G. W. Anderson* und *A. C. McGregor*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).

4) *I. Photaki*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2292 (1966).

5) *L. Zervas*, *I. Photaki*, *A. Cosmatos* und *D. Borovas*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4922 (1965).

6) *G. F. Holland* und *L. A. Cohen*, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 3765 (1958).

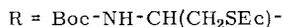
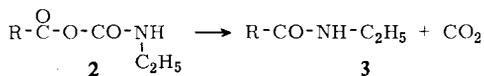


	R	Abkürzung
1a	H	
b	CH(C ₆ H ₅) ₂	Dpm
c	C(C ₆ H ₅) ₃	Trt
d	H ₂ C-  -OCH ₃	Mbz1
e	CH ₂ SCH ₂ C ₆ H ₅	Btm
f		Thp
g	COCH ₃	Ac
h	CONHC ₂ H ₅	Ec
i	COCH ₂ C ₆ H ₅	Z

erhalten wurde, nach bekannten Verfahren. Der tert.-Butyloxycarbonylrest wurde mittels Azidoameisensäure-tert.-butylester nach der pH-Stat-Methode von *Schnabel*⁷⁾ bei pH 9.5 eingeführt. Auf diese Weise wurden das *S*-Diphenylmethyl- (**1b**), *S*-Trityl- (**1c**), *S*-[*p*-Methoxy-benzyl]- (**1d**), *S*-Benzylthiomethyl- (**1e**) und das *S*-[Tetrahydropyranyl-(2)]-Derivat (**1f**) des *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteins (**1a**) erhalten. **1a** selbst entstand analog *Photaki*⁴⁾ durch Reduktion von *N,N'*-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Das von *Photaki* nur als Öl erhaltene Produkt konnten wir kristallin isolieren.

Von **1a** ausgehend haben wir die folgenden *S*-substituierten Derivate synthetisiert: *S*-Acetyl-*N*-tert.-butyloxycarbonyl- (**1g**), *S*-Äthylcarbamoyl-*N*-tert.-butyloxycarbonyl- (**1h**) und *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*S*-benzyloxycarbonyl-L-cystein (**1i**). Zur Darstellung von **1g** setzten wir **1a** mit Acetanhydrid in Gegenwart von Kaliumhydrogencarbonat, für **1h** mit Äthylisocyanat und für **1i** mit Chlorameisensäure-benzylester in Gegenwart von Natronlauge um.

Als bei der Synthese von **1h** statt äquimolarer Mengen ein mindestens 100proz. Überschuß an Äthylisocyanat eingesetzt wurde, entstand überraschend in fast quantitativer Ausbeute eine Verbindung, die auf Grund analytischer Daten nur das *N*-Äthylamid (**3**) von **1h** sein kann. Wir nehmen an, daß sich zunächst **1h** bildet, dessen freie Carboxylgruppe dann aber mit überschüssigem Äthylisocyanat zum gemischten Anhydrid **2** weiterreagiert, welches unter Decarboxylierung in **3** übergeht.



Die dargestellten Cysteinderivate vom Typ Boc-Cys(R) fielen meist nicht in reiner Form an. Mit Ausnahme von **1f** und **1a** wurden sie deshalb in die Dicyclohexylammoniumsalze übergeführt und anschließend mit wäßriger Citronensäure wieder freigesetzt.

⁷⁾ E. *Schnabel*, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die neu dargestellten Cysteinderivate sowie die physikalischen und analytischen Daten.

Eigenschaften der neu dargestellten Cysteinderivate

Nr.	Verbindung	Ausb. (%)	Schmp.	[α] _D ^{24*}	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse			
						C	H	N	S
1a	Boc-Cys(H)	79	76–78°	+ 8.1°	C ₈ H ₁₅ NO ₄ S (221.3)	Ber. 43.42 Gef. 43.94	6.83 6.85	6.33 6.58	14.49 14.33
1b	Boc-Cys(Dpm)	72	101°	– 6.6°	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄ S (387.5)	Ber. 65.07 Gef. 65.01	6.51 5.97	3.65 3.05	8.27 8.28
1c	Boc-Cys(Trt)	77	146°	+29.2°	C ₂₇ H ₂₉ NO ₄ S (463.6)	Ber. 69.95 Gef. 70.03	6.30 7.09	3.02 2.97	6.91 6.54
1d	Boc-Cys(MbzI)	68	90–92°	–22.5°	C ₁₆ H ₂₄ NO ₃ S (342.4)	Ber. 56.10 Gef. 56.77	7.06 6.77	4.09 4.03	9.36 9.50
1e	Boc-Cys(Btm)	62	86–87°	–28.2°	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄ S ₂ (357.5)	Ber. 53.75 Gef. 53.67	6.48 6.60	3.92 4.03	17.94 17.93
1f	Boc-Cys(Thp)	54	88°	–17.7°	C ₁₃ H ₂₃ NO ₃ S (305.4)	Ber. 51.12 Gef. 51.43	7.59 7.89	4.59 4.90	10.50 10.44
1g	Boc-Cys(Ac)	53	67–68°	–34.6°	C ₁₀ H ₁₈ NO ₃ S (264.3)	Ber. 45.33 Gef. 45.55	6.86 6.79	5.30 5.47	12.13 12.13
1h	Boc-Cys(Ec)	74	139°	–22.2°	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ S (292.4)	Ber. 45.18 Gef. 45.44	6.89 6.79	9.58 9.74	10.97 10.97
1i	Boc-Cys(Z)	59	127–129°	–33.9°	C ₁₆ H ₂₁ NO ₆ S (355.4)	Ber. 54.06 Gef. 54.14	5.95 5.71	3.94 4.02	9.02 9.05
3	Boc-Cys(Ec)–NHÄt	82	135–136°	– 8.0°	C ₁₃ H ₂₅ N ₃ O ₄ S (319.4)	Ber. 48.87 Gef. 48.90	7.89 7.56	13.15 13.14	10.03 9.94

*) (c = 1 in C₂H₅OH).

Wir danken dem *Gesamtverband der Textilindustrie* in der Bundesrepublik Deutschland, der *Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen* und dem *Bundesminister für Wirtschaft* für die Förderung des Forschungsvorhabens Nr. 1318 sowie dem *Landesamt für Forschung* des Landes Nordrhein-Westfalen. Dem *Verband der chemischen Industrie* und seinen Mitgliedsfirmen danken wir für die Überlassung von Chemikalien.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Monoskop bestimmt und sind nicht korrigiert.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden als Laufmittel die Systeme 75 Vol.-% Butanol-(2), 13.5 Vol.-% Ameisensäure (90%), 11.5 Vol.-% Wasser, und CMA (95 Vol. Chloroform, 5 Vol. Methanol, 3 Vol. Eisessig) verwendet.

1) *N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein (1a)*: 17.6 g (40 mMol) *N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin*⁴⁾ in 300 ccm flüssigem Ammoniak gelöst, wurden so lange mit *Natriumschnitzeln* versetzt, bis die Blaufärbung über 30 Sek. bestehen blieb. Nach Verdampfen des Ammoniaks wurde an der Ölpumpe 1 Stde. evakuiert und der Rückstand anschließend in Eiswasser gelöst, mit stark gekühlter 5proz. Salzsäure auf pH 2 gebracht und fünfmal mit je 100 ccm Essigester ausgeschüttelt. Nach zweimaligem Waschen der vereinigten Auszüge mit je 30 ccm Wasser und Trocknung über MgSO₄ hinterblieb beim Abdampfen i. Vak. ein schwach gelbliches Öl, das mit Petroläther verrieben nach einiger Zeit vollständig kristallisierte. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 13.5 g (79%), R_F 0.44 (CMA) (s. Tab.).

2) *S-Diphenylmethyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1b)*: 59.5 g (0.2 Mol) *S-Diphenylmethyl-L-cystein*⁸⁾ wurden in einem Gemisch von 200 ccm Wasser und 300 ccm Dioxan suspendiert und bei pH 9.5 und 45° mit 40 ccm *Azidoameisensäure-tert.-butylester*⁹⁾ umgesetzt. Mit 4 n NaOH wurde der pH-Wert durch einen Autotitrator konstant gehalten. Nach be-

⁸⁾ R. G. Hiskey und J. B. Adams, J. org. Chemistry **30**, 1340 (1965).

⁹⁾ L. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. **79**, 98 (1957).

endeter Umsetzung wurden Dioxan und Wasser i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 300 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung zweimal mit je 100 ccm Äther ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase stellte man in der Kälte mit fester Citronensäure auf pH 2 ein, zog die freigesetzte S-substituierte *Boc-Aminosäure* mit Essigester aus, wusch die Essigesterphase mit Wasser und trocknete über $MgSO_4$. Nach Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. verblieb ein gelbliches Öl, das in Äther gelöst wurde. Nach Hinzufügen von 36 g (0.2 Mol) *Dicyclohexylamin* wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt, dann das *Dicyclohexylammoniumsalz* abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Ausb. 97 g (85%).

Das Salz wurde in Wasser/Essigester suspendiert, durch Zugabe fester *Citronensäure* in der Kälte zerlegt, die freie *Boc-Aminosäure 1b* in Essigester aufgenommen, die Lösung gewaschen und getrocknet. Das nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. zurückbleibende Öl konnte aus Essigester/Petroläther kristallin erhalten werden. Ausb. 56 g (72%), R_F 0.49 (CMA).

3) *S-Triyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1c)*: Analog **1b** aus 36.3 g (0.1 Mol) *Cys(Trt)*¹⁰ in 100 ccm Wasser und 200 ccm Dioxan sowie 20 ccm (0.15 Mol) *Boc-N₃*. Ausb. 28 g (77%), R_F 0.50 (CMA).

4) *S-[p-Methoxy-benzyl]-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1d)*: Analog **1b** aus 48.5 g (0.2 Mol) *Cys(Mbz)*¹¹ in 150 ccm Wasser/300 ccm Dioxan und 40 ccm (0.3 Mol) *Boc-N₃*. Ausb. 46.5 g (68%), R_F 0.48 (CMA).

5) *S-Benzylthionethyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1e)*: Analog **1b** aus 51.5 g (0.2 Mol) *Cys(Btm)*¹² in 150 ccm Wasser/300 ccm Dioxan und 40 ccm (0.3 Mol) *Boc-N₃*. Ausb. 44 g (62%), R_F 0.48 (CMA).

6) *N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-[tetrahydropyranyl-(2)]-L-cystein (1f)*: Analog *S-Tetrahydropyranyl-L-cystein* (s. unter 11)) wurde in einem 0.37 m Ansatz *Cys(Thp)* dargestellt, jedoch nicht in Substanz isoliert. Der nach Verseifung mit 4 n NaOH anfallende Rückstand wurde unmittelbar mit 59 g (0.41 Mol) *Boc-N₃* nach dem pH-Stat-Verfahren bei pH 9.5 zum *Boc-Cys(Thp)* umgesetzt. Anschließend wurde ähnlich wie bei **1b** aufgearbeitet, jedoch auf eine Reinigung über das Dicyclohexylammoniumsalz verzichtet. Stattdessen wurde die Essigesterlösung des Rohproduktes über eine Al_2O_3 -Säule filtriert. Das Eluat wurde i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 61 g (54%), R_F 0.49 (CMA). Die Substanz ist ein Gemisch zweier Diastereomerer.

7) *S-Acetyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1g)*: 17.6 g (40 mMol) *N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin* wurden, wie bei **1a** beschrieben, mit *Natrium* und flüssigem *Ammoniak* reduziert. Der schwach salzsauren Lösung von *Boc-Cys* wurden in einer Stickstoffatmosphäre unter kräftigem Rühren und äußerer Eiskühlung 30 g (0.3 Mol) $KHCO_3$ und 12 ccm (0.12 Mol) *Acetanhydrid* in einem Guß hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stde. bei 0° und eine weitere bei Raumtemp. gerührt. Mit 5proz. Salzsäure stellte man die stark gekühlte Lösung auf pH 2 und reinigte über das Dicyclohexylammoniumsalz wie bei **1b**. Ausb. 10.5 g (53%), R_F 0.41 (CMA).

8) *S-Äthylcarbamoyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein (1h)*: 22.1 g (0.1 Mol) *Boc-Cys* in 200 ccm absol. Dimethylformamid versetzte man bei -20° mit 8 ccm (0.1 Mol) *Äthylisocyanat*, hielt eine Stde. im Kühlschrank, dann 12 Stdn. bei Raumtemp. und vertrieb das Dimethylformamid i. Vak. Die Reinigung über das Dicyclohexylammoniumsalz erfolgte wie bei **1b**. Ausb. 21.5 g (74%), R_F 0.28 (CMA).

¹⁰ L. Zervas und I. Photaki, J. Amer. chem. Soc. **84**, 3887 (1962).

¹¹ S. Sakakibara, Y. Nobuhara, Y. Shimonishi und R. Kiyoi, Bull. chem. Soc. Japan **38**, 120 (1965).

¹² P. J. E. Brownlee, M. E. Cox, B. O. Handford, J. C. Marsden und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1964**, 3832.

9) *N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-benzyloxycarbonyl-L-cystein* (**1i**): In einem 500-ccm-Dreihalskolben wurden unter Rühren 22.1 g (0.1 Mol) *Boc-Cys* in 100 ccm Dioxan und 200 ccm Wasser gelöst, unter Stickstoff auf 0° gekühlt und 17 g (0.1 Mol) *Chlorameisensäure-benzylester* in einem Guß zugesetzt. Im Laufe einer halben Stde. ließ man eine Lösung von 8 g (0.2 Mol) *Natriumhydroxid* in 100 ccm Wasser zutropfen und entfernte anschließend die Kühlung. Nach etwa 1 Stde. wurde die Stickstoffspülung beendet, das Lösungsmittelgemisch i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 100 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung zweimal mit je 50 ccm Äther ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase wurde in der Kälte mit fester Citronensäure auf pH 2 eingestellt, die freigesetzte *S*-substituierte *Boc*-Aminosäure mit Essigester ausgezogen, der Extrakt mit Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Eindampfen i. Vak. verblieb ein gelbliches Öl, das wie üblich in das *Dicyclohexylammoniumsalz* übergeführt wurde. Nach Zersetzung des Salzes wie bei **1b** Ausb. 21 g (59%), R_F 0.46 (CMA).

10) *S-Äthylcarbamoyl-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystein-äthylamid* (**3**): 17.7 g (0.08 Mol) *Boc-Cys* in 150 ccm absol. Dimethylformamid wurden bei -20° mit 0.3 Mol (21.3 g) *Äthylisocyanat* wie bei **1h** umgesetzt. Beim Abziehen des Dimethylformamids i. Hochvak. kristallisierte der Rückstand; er wurde zweimal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 21 g (82%), R_F 0.50 (CMA).

11) *S-[Tetrahydropyranyl-(2)]-L-cystein*: Nach Holland und Cohen⁶⁾ wurden 43 g (0.25 Mol) *Cystein-methylester-hydrochlorid* mit 21 g (0.25 Mol) *2.3-Dihydro-4H-pyran* in 150 ccm Methylenchlorid mehrere Std. unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. verdampft und der zähe, schmierige Rückstand in 250 ccm Dioxan warm gelöst. Nach Verdünnen mit 250 ccm Wasser wurden 80 ccm und nach etwa 1 Stde. weitere 45 ccm 4 *n* *NaOH* zugesetzt. Es wurde über Nacht gerührt, dann das Lösungsmittelgemisch i. Vak. restlos abgezogen, der Rückstand in 250 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung bei 0° mit fester *Citronensäure* auf pH 8 eingestellt. Nach etwa 4 Std. Stehenlassen im Kühlschrank wurde die mikrokristalline Fällung abgesaugt und zweimal aus Methanol/Wasser (1:1) umkristallisiert. Ausb. 19 g (37%, Lit.⁶⁾: keine Angabe); Schmp. 184° (Lit.⁶⁾: 187°; $[\alpha]_D^{23}$: -67.0°, $[\alpha]_D^{20}$: +11.6° ($c = 1.1$ in Wasser). (Die Substanz ist ein Gemisch zweier Diastereomerer in wechselnder Zusammensetzung.)

[429/68]