

Alfons Schöberl, Manfred Rimpler und Karl-Heinz Magosch

Notiz zur Synthese von D-Cystin und seinen Derivaten

Aus dem Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 21. Oktober 1968)

Die Darstellung größerer Mengen von D-Cystin, das neuerdings für Peptidsynthesen interessant wurde, stößt bis jetzt auf beträchtliche Schwierigkeiten¹⁾. Sie setzt eine bequeme Synthese von inaktivem Cystin bzw. seiner Derivate voraus, die einer nutzbringenden Spaltung in die Antipoden unterworfen werden können.

Unter solchen Aspekten wurde 1945 erstmals aus unserem Arbeitskreis im Zusammenhang mit Untersuchungen an cystinhaltigen Proteinen über die Anlagerung von Thioessigsäure an Acrylsäure²⁾ und α -Acetamino-acrylsäure³⁾ berichtet. Farlow⁴⁾ benutzte dabei Ascaridol als Katalysator.

Eine jetzt mitgeteilte Variante dieses Verfahrens ist im Hinblick auf chemische und biochemische Beziehungen zwischen Cystein und Serin beachtenswert. Entsprechend der Ansicht von Nicolet und Shinn⁵⁾, Acetylserin als beständiges Derivat des instabilen Dehydroalanins aufzufassen, konnte Rambacher⁶⁾ kürzlich aus Serin mit Acetanhydrid das Azlacton der α -Acetamino-acrylsäure herstellen, das in „statu nascendi“ Thioessigsäure anlagerte. Saure Hydrolyse lieferte anschließend DL-Cystein und nachfolgende Oxydation inaktives Cystin. Da jedoch für Peptidsynthesen häufig geschützte Cysteinderivate erforderlich sind, wobei der S-Benzylrest als Schutzgruppe eine Sonderstellung einnimmt, war besonders auch die leichte synthetische Zugänglichkeit von S-Benzyl-cystein von Interesse.

Mit dieser Zielsetzung wurde nunmehr das früher beschriebene Verfahren abgewandelt und Benzylmercaptan an α -Acetamino-acrylsäure (**1**) zu S-Benzyl-N-acetyl-DL-cystein (DL-2) addiert:



DL-2 war direkt als Substrat für eine Spaltung in die Antipoden verwendbar. Obwohl frühere Autoren⁷⁾ mit diesem Reaktionstyp nur unbefriedigende Ergebnisse erzielten, ließen sich nach Ausarbeitung exakter Versuchsbedingungen gute Ausbeuten erreichen. Wir arbeiteten in alkoholischen Lösungen und benutzten basische Katalysatoren (Piperidin, Triäthylamin oder einfach Na-Äthylat).

- 1) Vgl. z. B. J. P. Greenstein und M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Bd. III, S. 1892, J. Wiley & Sons, New York-London 1961; G. Losse und G. Moschall, J. prakt. Chem., 4. Reihe, 7, 38 (1958).
- 2) A. Schöberl und A. Wagner, Chem. Ber. 80, 379 (1947); vgl. Diplomarbeit A. Wagner, Univ. Würzburg 1945.
- 3) A. Schöberl und A. Wagner, Naturwissenschaften 34, 189 (1947); A. Schöberl, Angew. Chem., Ausg. A, 60, 308 (1948).
- 4) M. W. Farlow, J. biol. Chemistry 176, 71 (1948); Du Pont (Erf. M. W. Farlow), Amer. Pat. 2406362; C. 1947, 657.
- 5) B. H. Nicolet und L. A. Shinn, J. Amer. chem. Soc. 63, 2284 (1941).
- 6) P. Rambacher, Chem. Ber. 101, 2595 (1968).
- 7) B. H. Nicolet, J. biol. Chemistry 95, 389 (1932); J. Washington Acad. Sci. 28, 84 (1938); O. Süs, Liebigs Ann. Chem. 559, 92 (1948).

Eine andere, allerdings unrationelle Möglichkeit zur Darstellung von DL-2 geht von L-Cystin aus, das bekanntlich durch Säurebehandlung racemisiert werden kann⁸⁾. Dieses inaktive Cystin läßt sich reduzieren, benzylieren⁹⁾ sowie acetylieren¹⁰⁾, oder ein nach Reduktion zuerst hergestelltes S-Benzyl-L-cystein wird erst racemisiert^{11, 12)} und zu DL-2 weiterverarbeitet. Falls L-Cystein verfügbar, ist diese zweite Möglichkeit zu bevorzugen. Selbstverständlich kann auch das nach Rambacher⁶⁾ synthetisch zugängliche DL-Cystein in diese Reaktionsfolge eingeschleust werden.

DL-2 war für die Herstellung eines zu Synthesezwecken brauchbaren D-Cysteinderivates besonders geeignet. Für seine Spaltung in die optischen Antipoden wurde nach dem Prinzip von Bergmann und Fraenkel-Conrat¹³⁾ Papain verwendet, das uns in Form eines sehr wirksamen Papaya-Latex-Präparates vorlag. Papain war bereits früher einmal in unserem Arbeitskreis zur Racematspaltung von Homocystein eingesetzt worden¹⁴⁾. Das aus dem Filtrat der enzymatischen Spaltung erhaltene S-Benzyl-N-acetyl-D-cystein wurde wie das schwer lösliche, entsprechende L-Cystein-anilid durch saure Hydrolyse in das S-Benzylderivat übergeführt. Die Schutzgruppe ließ sich anschließend in flüssigem Ammoniak mit Natrium abspalten^{9, 11)}, und nachfolgende Oxydation lieferte D-Cystin. Als für Peptidsynthesen geeignete Derivate wurden aus S-Benzyl-D-cystein der Benzylester über das S-Benzyl-D-cystein-N-carboxyanhydrid und nach Carbobenzoxylierung der p-Nitrophenylester dargestellt.

Unser Dank gebührt dem *Fonds der Chemischen Industrie* für Chemikalienspenden, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für Forschungsmittel und Herrn Dr. P. Rambacher, Forschungslaboratorium des Werkes Pharmazell der Aschaffenburger Zellstoffwerke, Werk Redenfelden, für wertvolle substantielle Hilfe.

Beschreibung der Versuche

An den Experimenten waren Dipl.-Chem. G. Roth und Dipl.-Chem. E. Clauss beteiligt.

Schwefel wurde nach der Methode von Schöniger, Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Die spezif. Drehungen wurden mit einem Zeiss-Winkel-Kreis-Polarimeter auf $\pm 0.01^\circ$ gemessen.

S-Benzyl-N-acetyl-DL-cystein (DL-2): Zu einer Alkoholatlösung aus 1.15 g (0.05 Mol) Natrium in absol. Äthanol wurden 6.45 g (0.05 Mol) α -Acetamino-acrylsäure¹⁵⁾ (1) und 6.3 g (0.05 Mol) Benzylmercaptan gegeben und 2 Tage unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit 200 ccm Wasser versetzt und mehrmals mit 50 ccm Äther ausgeschüttelt. Unter Eiskühlung wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert und das farblose Produkt abgesaugt. Nach Waschen mit Wasser und Äther (Entfernung von etwa gebildetem Dibenzyldisulfid) wurde die Substanz getrocknet und aus 75 ccm 50proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 7.5 g (59%). Schmp. 157–159° (Lit.⁸⁾: 157°).

⁸⁾ H. S. Loring und V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **102**, 287 (1933).

⁹⁾ V. du Vigneaud, L. F. Audrieth und H. S. Loring, J. Amer. chem. Soc. **52**, 4500 (1930).

¹⁰⁾ S. M. Birnbaum und J. P. Greenstein, Arch. Biochem. Biophysics **39**, 108 (1952).

¹¹⁾ J. L. Wood und V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **130**, 109 (1939).

¹²⁾ B. Liberek, Z. Grzonka und A. Michalik, Roczniki Chem. [Ann. Soc. chim. Polonorum] **40**, 683 (1966).

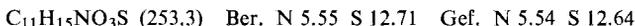
¹³⁾ M. Bergmann und H. Fraenkel-Conrat, J. biol. Chemistry **119**, 707 (1957).

¹⁴⁾ A. Schöberl und G. Täuber, Liebigs Ann. Chem. **599**, 23 (1956); vgl. auch L. J. Reed, A. R. Kidwai und V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **180**, 571 (1949).

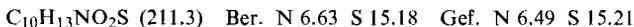
¹⁵⁾ M. Bergmann und K. Grafe, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **187**, 187 (1930); Th. Wieland, G. Ohnacker und W. Ziegler, Chem. Ber. **90**, 194 (1957); P. Rambacher, ebenda **101**, 3433 (1968).

Bei Verwendung von *Piperidin* oder *Triäthylamin* an Stelle von Natriumalkoholat wurden vor dem Ausschütteln 50 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung zugefügt.

Spaltung von S-Benzyl-N-acetyl-DL-cystein (DL-2) mit Papain: 12.65 g DL-2 wurden auf dem Wasserbad in 35 ccm *n* NaOH zusammen mit 200 ccm 0.2 *m* Dinatriumcitrat-Puffer (pH 5.0) und 9.3 ccm *Anilin* gelöst. Nun wurden dem Spaltansatz noch 0.8 g L-Cystein-hydrochlorid, 0.3 g Äthylendiamintetraessigsäure und ein Extrakt aus 3 g *Dried Papaya Latex*¹⁶⁾ in 50 ccm Citratpuffer zugefügt, sowie mit Pufferlösung auf 500 ccm aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3 Tage bei 40° im Brutschrank belassen, wobei das *S-Benzyl-N-acetyl-L-cystein-anilid* ausfiel. Dieses wurde abgesaugt, das Filtrat kalt mit Aktivkohle behandelt und das *S-Benzyl-N-acetyl-D-cystein* durch Ansäuern mit konz. Salzsäure auf pH 2 ausgefällt. Nach Absaugen wurde mit kaltem Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Ausb. 4.5 g (72%) *S-Benzyl-N-acetyl-D-cystein*, Schmp. 146°, $[\alpha]_{589}^{25}$: +44.2° (*c* = 1.062; Äthanol).

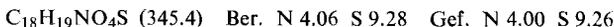


S-Benzyl-D-cystein: 20 g *S-Benzyl-N-acetyl-D-cystein* wurden mit 300 ccm 2*n* HCl 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten wurde die klare Lösung mit Carboraffin verrührt, filtriert und mit konz. Ammoniak auf pH 5 eingestellt. Das *S-Benzyl-D-cystein* wurde nach Aufbewahren im Kühlschrank abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 14.2 g (90%), Schmp. 212–215° (Z.), $[\alpha]_{580}^{25}$: –28° (*c* = 1; *n* NaOH). Lit.¹¹⁾: Schmp. nicht angegeben, $[\alpha]_D^{25}$: –25° (*c* = 1; Wasser).

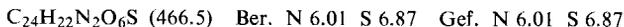


S-Benzyl-L-cystein: 50 g *S-Benzyl-N-acetyl-L-cystein-anilid* wurden 4 Stdn. unter Rückfluß in 3.5 *l* 4*n* HCl hydrolysiert. Danach wurde evaporiert und der Rückstand nach Behandlung mit Carboraffin aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 27 g (85%), Schmp. 215° (Z.), $[\alpha]_{580}^{20}$: +28° (*c* = 1; *n* NaOH). Lit.^{9,12)}: Schmp. 215°, $[\alpha]_D$: +28° (*c* = 1; *n* NaOH).

S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-D-cystein: Der Lösung von 10.6 g (0.05 Mol) *S-Benzyl-D-cystein* in 50 ccm *n* NaOH ließ man unter Rühren bei 0° gleichzeitig 30 ccm 2*n* NaOH und 9.4 g *Chlorameisensäure-benzylester* bei pH 10 zutropfen. Bei Raumtemperatur wurde anschließend 90 Min. gerührt und durch Wasserzugabe klare Lösung erreicht. Es wurde mit Äther ausgeschüttelt und die wäbr. Phase mit Carboraffin verrührt. Ansäuern mit konz. Salzsäure (pH 3–4), Extrahieren mit Essigester, Trocknen über Natriumsulfat und Evaporieren lieferte einen Rückstand, der aus Essigester/Petroläther umkristallisiert wurde. Ausb. 14.2 g (82%), Schmp. 94–95°, $[\alpha]_{580}^{24}$: +55.0° (*c* = 2; Dimethylformamid). Lit.¹⁷⁾: Schmp. 93–94°.



S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-D-cystein-[p-nitro-phenylester]: Zu 11.5 g (0.03 Mol) *S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-D-cystein* in 40 ccm Essigester wurden 6.1 g *p-Nitro-phenol* in 20 ccm Essigester gegeben und auf 0° gekühlt. Dazu tropfte man unter Rühren 6.9 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 20 ccm Essigester und ließ 60 Min. bei Raumtemperatur reagieren. Der ausgefallene Harnstoff wurde abgesaugt, das Filtrat evaporiert und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 10.5 g (85%), Schmp. 92°, $[\alpha]_{589}^{24}$: +42° (*c* = 2; Dimethylformamid). Lit.¹⁷⁾: Schmp. 92–93°.



¹⁶⁾ „*Dried Papaya Latex*“ wurde uns wiederholt von der Wallerstein Company, Div. of Baxter Laboratories, Staten Island 3, N.Y., USA, geliefert, wofür hier gedankt sei.

¹⁷⁾ D. B. Hope, V. V. S. Murti und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3686 (1963).

S-Benzyl-D-cystein-N-carboxyanhydrid: 21.1 g (0.1 Mol) *S-Benzyl-D-cystein* wurden in 500 ccm absol. Dioxan auf 40–50° erwärmt. Unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß wurde so lange *Phosgen* eingeleitet (ca. 4 Stdn.), bis eine klare Lösung entstand. Das Dioxan wurde evaporiert und der Rückstand aus absol. Benzol umkristallisiert. Ausb. 15.4 g (65%), Schmp. 106°, $[\alpha]_{589}^{25}$: +41.3° ($c = 2$; Dioxan).

$C_{11}H_{11}NO_3S$ (237.3) Ber. N 5.91 S 13.51 Gef. N 5.89 S 13.43

S-Benzyl-D-cystein-benzylester-hydrochlorid: 23.7 g (0.1 Mol) *S-Benzyl-D-cystein-N-carboxyanhydrid* und 49.5 g frisch dest. *Benzylalkohol* wurden gleichzeitig zu 700 ccm bei 0° mit *Chlorwasserstoff* gesättigtem absol. Äther gegeben; unter Rühren ließ man die Reaktionsmischung langsam erwärmen. Bei 30° erfolgte Kristallisation; aus Äthanol/Äther Ausb. 31 g (92%), Schmp. 128.5°, $[\alpha]_{589}^{24}$: +26.3° ($c = 1$; Methanol).

$C_{17}H_{20}NO_2S_2Cl$ (337.9) Ber. N 4.15 S 9.49 Gef. N 4.08 S 9.42

D-Cystein und D-Cystin: In einen 250-ccm-Dreihalskolben mit Rührer wurden ca. 200 ccm *Ammoniak* kondensiert. Dann wurden abwechselnd insgesamt 10.55 g (0.05 Mol) *S-Benzyl-D-cystein* und soviel *Natrium* zugefügt, bis eine Blaufärbung 1 Min. bestehen blieb. Nach Entfärbung mit Ammoniumchlorid ließ man das Ammoniak absieden und löste den Rückstand in 100 ccm Wasser. Unter Rühren wurde nun so lange *KJ₃*-Lösung zugetropft, als noch Entfärbung eintrat. Dabei fiel ein feiner farbloser Niederschlag von *D-Cystin* aus. Nach kurzer Zeit wurde abgesaugt, so lange mit Wasser gewaschen, bis eine Probe auf Jodid-Ionen negativ ausfiel, und bei 105° getrocknet. Nach dem Umfällen aus Ammoniak/Essigsäure lag der Zers.-P. bei 240–250°. Ausb. 2.2 g (37%), $[\alpha]_{589}^{25}$: +226° ($c = 1$, n HCl). Lit.¹¹⁾: $[\alpha]_D^{25}$: +224° ($c = 1$; n HCl).

$C_6H_{12}N_2O_4S_2$ (240.3) Ber. N 11.66 S 26.68 Gef. N 11.43 S 26.55

[481/68]