

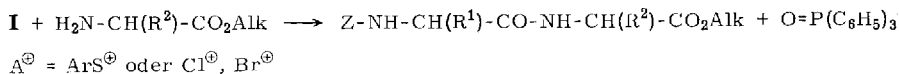
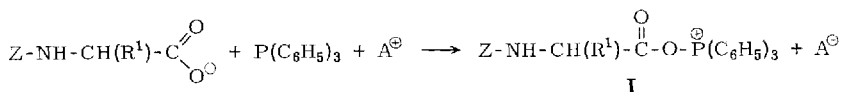
Theodor Wieland und Annemarie Seeliger

Peptidsynthesen, LII¹⁾

Notiz über eine einfache Peptidsynthese mit Triphenylphosphin plus Tetrachlorkohlenstoff als Kupplungsreagenzien

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Abteilung Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 3. August 1971)

Mitteilungen von *Appel*, *Kleinstück* und *Zahn* über die wasserabspaltende Wirkung des Systems Triphenylphosphin-Tetrachlorkohlenstoff, die z. B. aus Carbonsäureamiden Nitrile²⁾, aus Formamiden Isocyanide³⁾ und aus 1.3-disubstituierten Harnstoffen Carbodiimide⁴⁾ entstehen läßt, veranlaßte uns, dieses Prinzip für die Wasserabspaltung zwischen Carboxyl- und Aminogruppe, also für die Peptidsynthese, auszuprobieren. Derivate des dreiwertigen Phosphors (P³⁺) zusammen mit „weichen“ Oxydationsmitteln sind in letzter Zeit vereinzelt zur Bildung der Peptidbindung herangezogen worden. Durch Redoxreaktion von Sulfensäurederivaten (S⁺¹), wie z. B. ArSX (X = Cl, OAlkyl, SCN, SArlyl, NHR) mit Triäthylphosphit ließ sich eine Reihe von Benzyloxycarbonylaminosäuren (Z-Aminosäuren) mit Estern zweiter Aminosäuren in guten Ausbeuten zu Z-Dipeptidestern verknüpfen⁵⁾. Analog wirkt das Gemisch von Bis-[*o*-nitro-phenyl]-disulfid und Triphenylphosphin, wobei sich der Zusatz von mercaptid-bildenden Metall-Ionen (Cu²⁺, Hg²⁺) bewährte⁶⁾. Bei diesen Reaktionen tritt wohl als aktivierte Aminosäure ein Acyloxyphosphoniumsalz (**I**) auf, das sich unter der Einwirkung des Oxydationsmittels (A[⊕]) aus Phosphin und Carboxylat bildet, und das vom Aminosäureester aminolysiert wird:



Beim Erwärmen von Z- oder tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren (Boc-Aminosäuren) und Aminosäureestern mit Triphenylphosphin, CCl₄ und tert. Base entstehen die N-geschützten Dipeptidester in Ausbeuten von über 90%. Wir haben auf diese Weise z. B. Boc-Alanyl-phenylalanin-methylester (**I**) synthetisiert und, da die neutralen Produkte nur chromatographisch, d. h. verhältnismäßig umständlich vom Triphenylphosphinoxid abzutrennen sind, aus **I** nach Boc-Abspaltung mit HCl in Eisessig Alanyl-phenylalanin-methylester-hydrochlorid

¹⁾ LI. Mitteil.: *Th. Wieland, A. v. Dungen und Ch. Birr*, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

²⁾ *R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Zahn*, Chem. Ber. **104**, 1030 (1971).

³⁾ *R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Zahn*, Angew. Chem. **83**, 143 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. **10**, 132 (1971).

⁴⁾ *R. Appel, R. Kleinstück und K.-D. Zahn*, Chem. Ber. **104**, 1335 (1971).

⁵⁾ *Yu. W. Mitin und G. P. Wlasow*, Ber. Akad. Wiss. UdSSR **179**, 353 (1968), C. A. **69**, 77719 y (1968).

⁶⁾ *T. Mukayama, N. Weki, H. Maruyama und R. Matsueda*, J. Amer. chem. Soc. **90**, 4490 (1968).

(2) mit 95% Rohausbeute isoliert. Durch alkalische Hydrolyse wurde aus 1 Boc-Alanyl-phenylalanin (3) mit derselben hohen Ausbeute erhalten. Nach Abschluß unserer Versuche erfahren wir, daß dieselbe Kondensationsreaktion als einfache Synthese von Amidem auch von *Barstow* und *Hruby*⁷⁾ erkannt worden ist, die ebenfalls ein Beispiel für eine Peptidsynthese mit Bromtrichlormethan als Oxydationsmittel angeben. In unserem Fall wirkt Cl^\ominus (aus CCl_4), in diesem Br^\oplus als A^\oplus im obigen Schema.

- 1 Boc-Ala-Phe-OCH₃
- 2 H-Ala-Phe-OCH₃ · HCl
- 3 Boc-Ala-Phe-OH
- 4 Boc-Ala-Phe-Pro-OCH₃

Da der Wert einer Peptidsynthese sehr stark vom Ausmaß der Racemisierung abhängt, das die Acylkomponente erleidet, haben wir dieses am Beispiel der Verknüpfung von Boc-L-alanyl-L-phenylalanin (3) mit L-Prolin-methylester untersucht. Der nach Chromatographie mit 65% Ausbeute erhaltene Boc-Tripeptidester 4 wurde 20 Stdn. bei 100° mit 6*n* HCl hydrolysiert⁸⁾. Im Hydrolysat wurden die Aminosäuren mit Isopropylalkohol/HCl verestert, dann mit Trifluoressigsäureanhydrid am Stickstoff trifluoracetyliert. Die Gaschromatographie an einer mit Trifluoracetyl-L-phenylalanyl-L-leucin-cyclohexylester belegten Stahlkapillare⁹⁾ ergab, daß ca. 60% des Phenylalanins aus dem Tripeptid als D-Form und 40% als L-Form vorlagen. So hat die Einwirkung von Triphenylphosphin und CCl_4 unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen zur völligen Racemisierung der zu aktivierenden Aminosäure geführt.

Herrn Dr. *W. König* danken wir auch hier für die Racemat-Analyse.

Beschreibung der Versuche

tert.-Butyloxycarbonyl-alanyl-phenylalanin-methylester (1): 3.78 g (20 mMol) *Boc-L-alanin*, 4.31 g (20 mMol) *i-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid* und 6.54 g *Triphenylphosphin* (25 mMol) wurden in 40 ccm trockenem Chloroform (p. a.) mit 5.6 ccm *Triäthylamin* (40 mMol) und 2 ccm *Tetrachlorkohlenstoff* (20 mMol) 1½ Stdn. auf 60° erhitzt. Dann wurde nach Zusatz von 15% der ursprünglich eingesetzten Menge an Phosphin und CCl_4 sowie 7.5% Triäthylamin weitere 250 Min. auf 60° erwärmt. Nach Verdünnen des Reaktionsgemischs mit Chloroform auf 250 ccm wurde 5mal mit 10proz. Citronensäure und 5mal mit 10proz. KHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, dann nach Trocknen die Chloroformlösung i. Vak. verdampft. Zur Reinigung des *Boc-Dipeptidesters* 1 wurden 1.1 g des noch Triphenylphosphinoxid enthaltenden Sirups in Methanol an einer 30 × 230-cm-Säule von Sephadex LH-20 chromatographiert (Uvicord). Dabei wird 1 deutlich getrennt vor dem Phosphinoxid eluiert. Man erhielt 525 mg 1 vom Schmp. 84–86° (Lit.¹⁰⁾: 81–83°).

Alanyl-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (2): Der Sirup von 1 wurde in 80 ccm 1*n* HCl in Eisessig gelöst und nach 2½ stdg. Aufbewahren bei Raumtemp. i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde wieder in Chloroformlösung 3mal mit je 50 ccm Wasser ausgeschüttelt; die wäßrige Phase eingedampft und der Rückstand im Exsikkator getrocknet (5.47 g, 95%). Umkristallisieren aus wenig Äthanol mit absol. Äther gibt 4 g analysenreines *Hydrochlorid* 2 vom Schmp. 104–106°.

⁷⁾ *L. E. Barstow* und *V. J. Hruby*, *J. Org. Chemistry* **36**, 1305 (1971).

⁸⁾ Ausgeführt im Laboratorium des Lehrstuhls für Organische Chemie, Tübingen, von Dr. *W. König*.

⁹⁾ *W. König*, *W. Parr*, *H. Lichtenstein*, *E. Bayer* und *I. Oro*, *J. Chromatogr. Sci.* **8**, 183 (1970).

¹⁰⁾ *Th. Wieland*, *J. Faesel* und *W. Konz*, *Liebigs Ann. Chem.* **722**, 197 (1969).

tert.-Butyloxycarbonyl-alanyl-phenylalanin (**3**): 525 mg chromatographisch gereinigtes, nach obiger Methode hergestelltes **1** wurde in 5 ccm Dioxan mit 1.1 Äquivv. 1*n* NaOH 2 Stdn. bei Raumtemp. unter allmählicher Zugabe von 5 ccm Wasser gerührt. Dann wurde i. Vak. verdampft und der Rückstand nach Auflösen in Wasser 2mal mit Äther ausgeschüttelt. Danach säuerte man auf pH 2–3 an und schüttelte das *Boc-Dipeptid* mit Chloroform aus. Nach Trocknen und Eindampfen erhielt man 480 mg (95%) sirupöse Substanz.

tert.-Butyloxycarbonyl-alanyl-phenylalanyl-prolin-methylester (**4**): 480 mg **3** wurden zusammen mit 249 mg *Prolin-methylester-hydrochlorid* und 490 mg *Triphenylphosphin* in 5 ccm Chloroform nach Zusatz von 0.42 ccm *Triäthylamin* und 0.15 ccm CCl_4 60 Min. auf 60° erwärmt. Dann wurde nach Zugabe von je 15% *Triphenylphosphin* und CCl_4 sowie 7.5% *Triäthylamin* weitere 2½ Stdn. auf 60° erwärmt. Nach Verdünnen mit 50 ccm Chloroform wurde wie bei **1** beschrieben aufgearbeitet. Zur Trennung vom Phosphinoxid wurden 1.05 g Gemisch wie oben chromatographiert. Dabei erhielt man 410 mg *Boc-Tripeptidester* (64%) als farblose feste dünnschichtchromatographisch einheitliche Masse.

Aminosäureanalyse: Ala 1.0 Phe 0.97 Pro 1.1

Wie oben geschildert, handelt es sich hier um das Gemisch von 2 diastereomeren *Tripeptid*-Derivaten mit Phenylalanin in der L- und D-Form.

Aus der bei der Reinigung benutzten $KHCO_3$ -Lösung konnten durch Ansäuern 160 mg *Boc-Alanyl-phenylalanin* zurückgewonnen werden.

[312/71]