

## Notizen

### Tertiäres Phosphan/Hexachlorethan als Kondensationsreagenz für die Peptidsynthese: Die Synthese von Bradykinin<sup>1)</sup>

Rolf Appel\* und Lothar Willms

Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Bonn,  
Gerhard-Domagk-Str. 1, D-5300 Bonn 1

Eingegangen am 2. November 1978

#### Tertiary Phosphane/Hexachloroethane as Condensing Agent in Peptide Synthesis: The Synthesis of Bradykinin<sup>1)</sup>

In order to evaluate the usefulness of the tris(dimethylamino)phosphane/hexachloroethane/1-hydroxybenzotriazole method in peptide synthesis, the nonapeptide bradykinin was synthesized.

Um die Leistungsfähigkeit des Tris(dimethylamino)phosphan/Hexachlorethan/1-Hydroxybenzotriazol-Kombinationsverfahrens<sup>2)</sup>, abgekürzt THH, auch bei der Synthese von komplizierten Oligopeptiden zu erproben, wurde das Peptidhormon Bradykinin synthetisiert.

Basierend auf dem Syntheseschema von Nishimura und Fujino<sup>3)</sup> entwickelten wir einen Syntheseplan, bei dem alle Kondensationsschritte ausschließlich nach dem THH-Verfahren durchgeführt wurden.

Die Auswahl der Schutzgruppen und der Syntheseplan sind aus Schema 1 ersichtlich. Die Hydroxylgruppe von Serin blieb während der ganzen Synthese ohne Schutz, da kein Angriff auf die Seitenkette dieser Aminosäure befürchtet werden mußte. Die Guanidino-Funktion von Arginin wurde durch die Nitrogruppe blockiert.

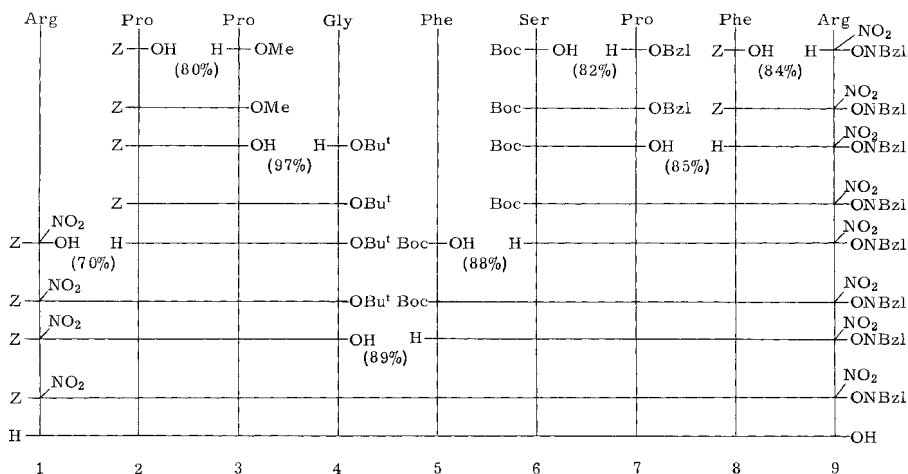
Zur Synthese der *N*-terminalen Sequenz 1–4 haben wir zunächst aus Benzyloxycarbonyl-L-prolin und Prolin-methylester das geschützte Dipeptid Z-Pro-Pro-OMe<sup>4)</sup> hergestellt, das zu Z-Pro-Pro-OH verseift und durch Kondensation mit H-Gly-OBu<sup>1</sup> in das Tripeptid Z-Pro-Pro-Gly-OBu<sup>1,3)</sup> übergeführt wurde. Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe und die anschließende Umsetzung mit Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH lieferte den Tetrapeptid-ester Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-OBu<sup>1</sup> ( $[\alpha]_D^{20} = -63.3^\circ$  ( $c = 1$ , DMF)). Mit Trifluoressigsäure wurde die *tert*-Butylschutzgruppe zu dem *N*-geschützten Tetrapeptid Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-OH abgespalten, welches von Schwyzer<sup>5)</sup> ohne Angabe analytischer Daten erwähnt worden ist ( $[\alpha]_D^{20} = -105^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol)).

Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppe in Boc-Ser-Pro-OBzl<sup>2)</sup> und die Umsetzung mit H-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl<sup>6)</sup> (aus Z-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl<sup>2)</sup> durch Einwirkung von HBr/Eisessig freigesetzt) lieferte das Tetrapeptid Boc-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl. Dieses Derivat war bereits von Suzuki et al. auf einem anderen Weg erhalten worden<sup>7)</sup>. Der Drehwert ( $[\alpha]_D^{20} = -52.8^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure)) wich in hohem Maße von dem Literaturwert<sup>7)</sup> ( $[\alpha]_D^{20} = -35.2^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure)) ab. Zur Überprüfung wurde das Tetrapeptid daher in einem Parallelversuch nach dem Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-Verfahren<sup>8)</sup> aufgebaut. Die analytischen Daten des so in 73 proz. Ausbeute erhaltenen Peptidderivates ( $[\alpha]_D^{20} = -54.8^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure)) stimmten mit den nach unserem Verfahren erhaltenen Werten überein.

Aus dem Tetrapeptid Boc-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl ließ sich mit Trifluoressigsäure die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe abspalten und das erhaltene Hydrochlorid mit Boc-Phe-OH in hoher Ausbeute (88%) zu dem geschützten Pentapeptid Boc-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-

ONBzl umsetzen ( $[\alpha]_D^{20} = -32.6^\circ (c = 1, \text{DMF})$ ). Nach der Demaskierung mit Trifluoressigsäure wurde das erhaltene H-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl mit Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-OH zum geschützten Nonapeptid (89%) umgesetzt. Das Derivat war bezüglich der Schutzgruppenkombination mit dem von *Boissonnas*<sup>6)</sup> und *Arold*<sup>9)</sup> beschriebenen Peptid identisch, so daß die analytischen Daten direkt verglichen werden konnten: Schmp. 125–135°C,  $[\alpha]_D^{20} = -45.8^\circ (c = 2.3, \text{DMF})$ ; Lit.<sup>6)</sup> Schmp. 185°C,  $[\alpha]_D^{22} = -44.6 \pm 0.5^\circ (c = 2.1, \text{DMF})$ ; Lit.<sup>9)</sup> Schmp. 135–138°C,  $[\alpha]_D^{25} = -50.7^\circ (c = 2.3, \text{DMF})$ .

Schema 1. Synthesepfad der Bradykinin-Gesamtsequenz 1–9



Das geschützte Bradykinin wurde durch katalytische Hydrierung in Methanol/Eisessig von allen Schutzgruppen befreit – hierbei wurde die Hydrierdauer von 30 Stunden nicht überschritten<sup>10)</sup> – und das erhaltene Rohprodukt an Sephadex LH-20 chromatographiert. Anschließend wurde das Nonapeptid aus Methanol/Eisessigester umgefällt und lyophilisiert. Ausbeute 86% ( $[\alpha]_D^{20} = -85.4^\circ (c = 1.1, \text{Wasser})$ ; Lit.<sup>11)</sup>  $[\alpha]_D^{23} = -82.8^\circ (c = 1.1, \text{Wasser})$ ). Die Aminosäureanalyse des Bradykinin-acetat-hydrats stimmte mit den berechneten Werten gut überein. Im biologischen Test am isolierten Ratten-Uterus zeigte das synthetische Peptidhormon die gleiche Aktivität wie natürliches Bradykinin.

Mit der beschriebenen Bradykinin-Synthese ist es gelungen, das THH-Verfahren erfolgreich bei der Synthese eines höheren Peptids einzusetzen. An nahezu allen Stellen konnten die in der Literatur angegebenen Ausbeuten erheblich verbessert werden. Auch die Aufarbeitung der Reaktionsansätze gestaltete sich bemerkenswert einfach, da die meisten Peptidderivate durch einfaches Auswaschen und Umkristallisieren von Verunreinigungen befreit werden konnten.

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Zahn und Herrn Dr. J. Föhles, Deutsches Wollforschungsinstitut Aachen, für die Durchführung der Aminosäureanalyse, Herrn Dir. Dr. S. Schütz und Herrn Dr. W. P. Mürrmann, Bayer A. G. Wuppertal-Elberfeld, für den biologischen Vergleich des Nonapeptids mit natürlichem Bradykinin.

## Experimenteller Teil

Die Kondensationen wurden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Peptidverknüpfung mit R<sub>3</sub>P/C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>/N-Hydroxyverbindung<sup>2)</sup> unter Verwendung von je 1.1 Äquivalenten (Me<sub>2</sub>N)<sub>3</sub>P/C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>/1-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid/Dichlormethan-Gemischen durchgeführt.

1. *Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-prolin-methylester*: Ausb. 80%, Schmp. 72–75°C (Lit.<sup>4</sup> 76–78°C).

2. *Benzyloxycarbonyl-L-propyl-L-prolin*: Aus Z-Pro-Pro-OMe durch Verseifen mit 2 N NaOH. Ausb. 90%, Schmp. 185–186°C,  $[\alpha]_D^{20} = -102.5^\circ$  ( $c = 2.2$ , Methanol) [Lit.<sup>4</sup> Schmp. 185.5 bis 187°C,  $[\alpha]_D^{20} = -103.5^\circ$  ( $c = 2.2$ , Methanol)].

3. *Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-prolyl-glycin-tert-butylester*: Aus Z-Pro-Pro-OH und H-Gly-OBu<sup>1</sup>, Lösungsmittel Dichlormethan. Ausb. 97%. Die Verbindung bleibt als Schaum zurück.  $[\alpha]_D^{20} = -108^\circ$  ( $c = 1$ , Ethanol).

4. *L-Prolyl-L-prolyl-glycin-tert-butylester · TosOH*: Aus Z-Pro-Pro-Gly-OBu<sup>1</sup> durch katalytische Hydrierung an Palladiumschwarz unter gleichzeitiger Titration mit 1 N methanol. *p*-Toluolsulfonsäure bei pH 4.5. Ausb. 93%, Schmp. 45–70°C;  $[\alpha]_D^{20} = -73.4^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

5. *Benzyloxycarbonyl-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-propyl-glycin-tert-butylester*: Aus Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH und H-Pro-Pro-Gly-OBu<sup>1</sup>, Lösungsmittel Acetonitril. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über Kieselgel (Woelm 0.063–0.1 mm) in Essigester/Methanol (9:1) chromatographiert und aus Essigester/Diethylether umgefällt. Ausb. 70%, Schmp. 50–80°C;  $[\alpha]_D^{20} = -63.3^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> · H<sub>2</sub>O (678.8) Ber. C 53.08 H 6.83 N 16.51 Gef. C 52.77 H 6.81 N 16.62

6. *Benzyloxycarbonyl-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycin*: 13.5 g (20 mmol) Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-OBu<sup>1</sup> werden 30 min in 60 ml wasserfreier Trifluoressigsäure bei Raumtemp. gerührt. Danach destilliert man die Trifluoressigsäure i. Vak. ab, nimmt den Rückstand in 150 ml 1 N KHCO<sub>3</sub> auf, wäscht mit Essigester und säuert bei 0°C mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> an. Die wäbrige Phase wird intensiv mit Essigester extrahiert, die Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingeengt und der Rückstand aus Aceton/Diethylether umgefällt. Ausb. 9.89 g (79%). Laut <sup>1</sup>H-NMR-Integration enthält die Verbindung ca. 0.25 Äquivalente Essigester. Schmp. 120–150°C;  $[\alpha]_D^{20} = -105^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol).

C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> · 0.25 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (626.7) Ber. C 51.75 H 6.11 N 17.88  
Gef. C 51.29 H 6.23 N 17.80

7. *tert-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-prolin*: 15.7 g (40 mmol) Boc-Ser-Pro-OBzl<sup>2)</sup> werden in 400 ml Methanol nach Zugabe von 2 g Palladium-Aktivkohle bis zur Beendigung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung hydriert (ca. 4 h). Das Filtrat wird einrotiert, der Rückstand mit *n*-Hexan verrieben und aus Essigester/Petrolether (60/80°C) umkristallisiert. Ausb. 9.78 g (81%), Schmp. 141–143°C,  $[\alpha]_D^{20} = -53.8^\circ$  ( $c = 0.56$ , DMF) [Lit.<sup>3)</sup> Schmp. 147–148°C,  $[\alpha]_D^{22} = -52.6^\circ$  ( $c = 0.56$ , DMF)].

8. *tert-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginin-p-nitrobenzylester*: Zu einer Lösung von 10 g (16 mmol) H-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl · HBr – hergestellt aus Z-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl<sup>2)</sup> nach Lit.<sup>6)</sup> – in 60 ml Dimethylformamid werden bei 0°C 3.4 ml (24 mmol) Triethylamin gegeben. Nach 30 min wird vom ausgefallenen Hydrobromid abfiltriert und das Filtrat mit 4.85 g Boc-Ser-Pro-OH (16 mmol), 2.5 g (18.5 mmol) HOBt und bei –20°C mit 4.1 ml *N*-Ethylmorpholin und 17.5 ml 1 N (Me<sub>2</sub>N)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>-Lösung – aus (Me<sub>2</sub>N)<sub>3</sub>P/C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub> in Dichlormethan nach Lit.<sup>2)</sup> erzeugt – versetzt. Man läßt 2 h bei –20°C und 24 h bei Raumtemp. rühren, dampft i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf und wäscht mit 0.2 N HCl, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und gesättigter NaCl-Lösung. Der nach Eindampfen verbleibende Schaum wird durch Chromatographie an SiO<sub>2</sub> in Essigester/Methanol (8:1) gereinigt und aus Essigester/Diethylether/Petrolether bei –20°C umgefällt. Ausb. 10.72 g (85%), Schmp. 93–110°C,  $[\alpha]_D^{20} = -52.8^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure) [Lit.<sup>7)</sup> Schmp. 91–110°C,  $[\alpha]_D^{23} = -35.2^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure)].

C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> (785.8) Ber. C 53.49 H 6.03 N 16.04 Gef. C 53.24 H 5.97 N 16.01

Zur Überprüfung wurde die gleiche Substanz nach dem DCCI/HOBt-Verfahren<sup>8)</sup> synthetisiert. Ausb. 73%, Schmp. 95–110°C;  $[\alpha]_D^{20} = -54.8^\circ$  ( $c = 0.9$ , Essigsäure).

9. *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-seryl-*L*-prolyl-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginin-*p*-nitrobenzylester: Aus H-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl – hergestellt aus Boc-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl nach Lit.<sup>7)</sup> – und Boc-Phe-OH. Ausb. 88%, Schmp. 110–115°C (Essigester/Petrolether);  $[\alpha]_D^{20} = -32.6^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>·H<sub>2</sub>O (951.0) Ber. C 55.57 H 6.15 N 14.73 Gef. C 55.73 H 5.98 N 14.89

10. Benzoyloxycarbonyl-nitro-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-phenylalanyl-*L*-seryl-*L*-prolyl-*L*-phenylalanyl-nitro-*L*-arginin-*p*-nitrobenzylester: 4.75 g (5 mmol) Boc-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl werden in 20 ml eiskalter Trifluoressigsäure gelöst. Nach 30 min engt man die Lösung i. Vak. ein, löst den Rückstand in 20 ml Methanol, versetzt mit 1.3 ml 3.95 N HCl/Dioxan und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit absol. Ether verrieben und i. Hochvak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und KOH getrocknet. Das Produkt wird ohne Charakterisierung mit 2.82 g (4.5 mmol) Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-OH und 1.25 g HOBt in 50 ml Acetonitril/20 ml DMF gelöst und bei –20°C mit 1.9 ml *N*-Ethylmorpholin und 4.7 ml 1 N (Me<sub>2</sub>N)<sub>3</sub>PCl<sub>2</sub>-Lösung<sup>2)</sup> versetzt. Man läßt 2 h bei –20°C, 14 h bei 0°C und 24 h bei Raumtemp. rühren und engt auf ca. 40 ml ein. Nach Zugabe von 400 ml *n*-Butanol/400 ml Essigester wird die Lösung mit 0.2 N HCl, 1 N NH<sub>3</sub> und gesätt. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und auf ca. 100 ml eingengt, wobei das Peptidderivat ausfällt. Nach Absaugen wird aus 600 ml *n*-Butanol umkristallisiert und i. Hochvak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Ausb. 5.89 g (89%), Schmp. 125–135°C,  $[\alpha]_D^{20} = -45.8^\circ$  ( $c = 2.3$ , DMF) [Lit.<sup>6)</sup> Schmp. 185°C,  $[\alpha]_D^{22} = -44.6 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 2.1$ , DMF), Lit.<sup>9)</sup> Schmp. 135–138°C,  $[\alpha]_D^{25} = -50.7^\circ$  ( $c = 2.3$ , DMF)].

C<sub>65</sub>H<sub>82</sub>N<sub>18</sub>O<sub>19</sub>·3 H<sub>2</sub>O (1473.5) Ber. C 52.98 H 6.02 N 17.11 Gef. C 52.86 H 5.99 N 16.72

11. *L*-Arginyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-phenylalanyl-*L*-seryl-*L*-prolyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginin-diacetat: 1.0 g (0.68 mmol) Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-ONBzl werden in 80 ml Eisessig/40 ml Methanol 30 h an 1 g Pd/BaSO<sub>4</sub> (Zugabe in vier Portionen) hydriert. Der Katalysator wird abgetrennt, die Lösung einrotiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert, einrotiert und der Rückstand in 10 ml Methanol gelöst. Nach Reinigung über Sephadex LH-20 (120 × 2 cm, Laufmittel Methanol) wird die Substanz aus Methanol/Essigester zweimal umgefällt und lyophilisiert. Ausb. 0.72 g (86%), Schmp. 165–170°C,  $[\alpha]_D^{20} = -85.4^\circ$  ( $c = 1.1$ , Wasser) [Lit.<sup>11)</sup> Schmp. 150–160°C,  $[\alpha]_D^{23} = -82.8^\circ$  ( $c = 1.1$ , Wasser)].

C<sub>54</sub>H<sub>81</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub>·3 H<sub>2</sub>O (1234.4) Ber. C 52.54 H 7.10 N 17.02 Gef. C 51.34 H 7.15 N 16.84

Aminosäureanalyse (Totalhydrolyse in 6 N HCl, 110°C, 24 h; Analysator LC 6000 E der Fa. Biotronik):

Ber. Arg 2.00 Phe 2.00 Pro 3.00 Ser 1.00 Gly 1.00 Orn 0.00

Gef. Arg 1.92 Phe 2.00 Pro 2.93 Ser 0.93 Gly 1.02 Orn 0.06

## Literatur

- <sup>1)</sup> 8. Mitteilung über phosphororganische Peptidknüpfungsreagentien; 7. Mitteil.: siehe Lit.<sup>2)</sup>.
- <sup>2)</sup> R. Appel und L. Willms, Chem. Ber. **112**, 1057 (1979), vorstehend.
- <sup>3)</sup> O. Nishimura und M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. **24**, 1568 (1976).
- <sup>4)</sup> E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **332**, 288 (1963).
- <sup>5)</sup> R. Schwyzler, Helv. Chim. Acta **43**, 1130 (1960).
- <sup>6)</sup> R. A. Boissonnas, S. Guttman und P.-A. Jaquenoud, Helv. Chim. Acta **43**, 1349 (1960).
- <sup>7)</sup> K. Suzuki, T. Abiko und M. Asaka, Chem. Pharm. Bull. **14**, 217 (1966).
- <sup>8)</sup> W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).
- <sup>9)</sup> H. Arold und D. Stibenz, J. Prakt. Chem. **312**, 1161 (1970).
- <sup>10)</sup> D. J. Schafer, G. T. Young, D. F. Elliot und R. Wade, J. Chem. Soc. C **1971**, 46.
- <sup>11)</sup> E. D. Nicolaidis und H. A. De Wald, J. Org. Chem. **26**, 3872 (1961).