

94. Cystinpeptide aus (S-Acetamidomethyl-cystein)-peptiden durch Oxydation mit Jod: Die Synthese von *cyclo-L-Cystin*

von **B. Kamber**

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der *CIBA-GEIGY AG.*, Basel

(22. III. 71)

Summary. The conversion of S-acetamidomethyl cysteine peptides to cystine peptides by a reaction with iodine is described. The method is applied in the synthesis of the hitherto unknown *cyclo-L-cystine*. The structure of this compound was confirmed by molecular weight determination, NMR. and mass spectroscopy.

Die Verwendung der Acetamidomethylgruppe ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$; Acm) zum intermediären Schutz der Mercaptogruppe von Cystein wurde kürzlich von *Veber et al.* [1] beschrieben und ihre Brauchbarkeit in der Synthese von Ribonuclease-S-Protein in eindrucklicher Weise gezeigt [2]. Für die Freisetzung der Thiolgruppe aus den geschützten Derivaten verwendeten die Autoren Quecksilber(II)-Salze bei pH 4.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass mit dieser neuen Schwefelschutzgruppe versehene Cysteinpeptide durch Oxydation mit Jod in äusserst einfachem Verfahren direkt in Cystinpeptide übergeführt werden können¹⁾.

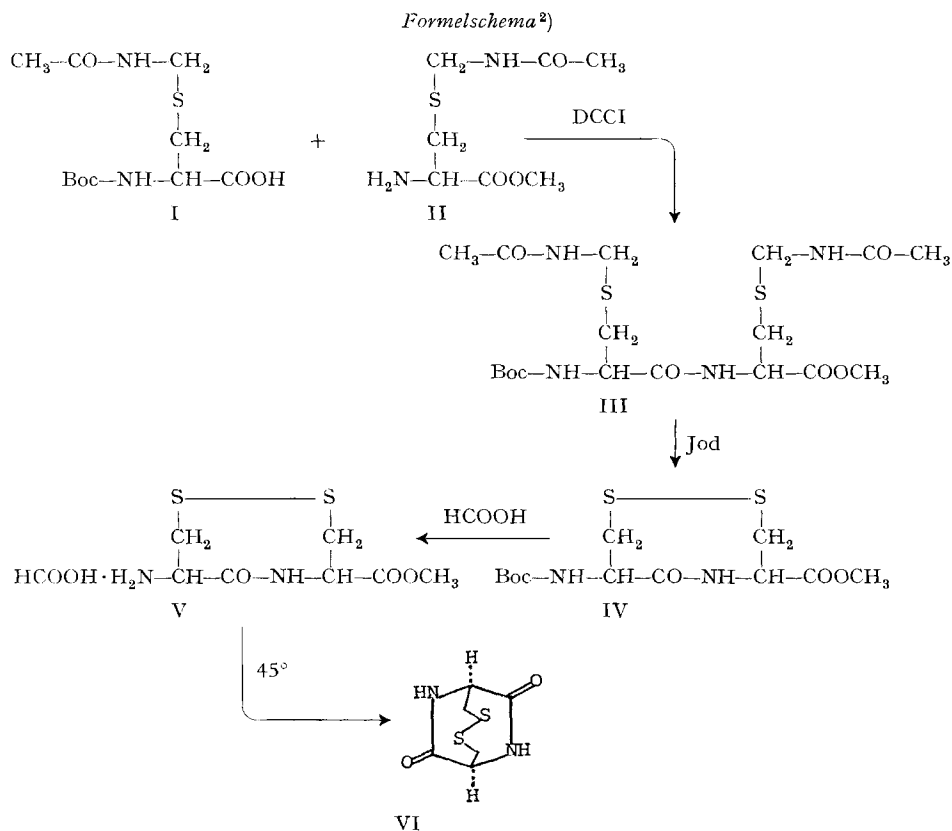
Die neue Methode wird mit der Synthese des noch nicht beschriebenen *cyclo-L-Cystins* (VI) illustriert (siehe Formelschema).

Die Kondensation von Boc-Cys(Acm)-OH (I) [1] mit H-Cys(Acm)-OMe (II) (aus H-Cys(Acm)-OH [1] durch Veresterung mit Thionylchlorid und Methanol nach *Brenner & Huber* [5] erhalten) lieferte das kristalline Dipeptid III. Zur Bildung des achthgliedrigen Disulfidringes in IV wurde eine methanolische Lösung von III bei Raumtemperatur langsam in eine stark gerührte Lösung von Jod in Methanol getropft. Bei dem dabei kristallin erhaltenen Reaktionsprodukt (84% Ausbeute) wurde durch eine Molekulargewichtsbestimmung (vaporometrische Methode [6]) gezeigt, dass es sich um das monomere Cystinderivat IV und nicht um ein polymeres Disulfid handelt.

Zur Überführung von IV in das Diketopiperazin VI wurde das von *Nitecki et al.* [7] beschriebene Verfahren angewendet. Die Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe mit 98-proz. Ameisensäure führte zum Formiat des Dipeptid-methylesters V. Die Cyclisierung desselben zu VI gelang unter bemerkenswert milden Bedingungen. Während für die Bildung von Dioxopiperazinen nach dieser Methode üblicherweise längeres Kochen in einem *sec*-Butanol-Toluol-Gemisch erforderlich ist, kristallisierte VI schon aus einer methanolischen Lösung von V bei 45° nach kurzer Zeit aus.

Die Umkristallisation aus Eisessig oder Methanol lieferte *cyclo-L-Cystin* (VI) als sehr feine Nadeln, die sich zwischen 250° und 310° zersetzen. Sie sind in Dimethylsulfoxid gut, in den anderen üblichen Lösungsmitteln nur spärlich löslich.

¹⁾ Die Umsetzung von S-Tritylcystein-Derivaten mit Jod unter direkter Bildung von Cystinpeptiden wurde schon früher beschrieben [3].



Die Molekulargewichtsbestimmung (isopiestic, Dioxopiperazin als Vergleichssubstanz, Trifluoressigsäure als Lösungsmittel, ausgeführt nach [8]) ergab als Mittel von 10 Messungen einen Wert von 192 ± 20 (ber. 204,3).

Im NMR.-Spektrum sind die beiden Methylengruppen und die zwei α -Protonen magnetisch äquivalent. Das Spektrum ist vom Typus $ABCX$, wobei das Proton B praktisch keine Kopplung mit dem α -Proton aufweist. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind: H_A , $\delta = 2,98$ ppm; H_B , $\delta = 3,46$ ppm; H_C , $\delta = 4,08$ ppm; $H_{X(\text{NH})}$, $\delta = 8,03$ ppm. $J_{A,B} \cong 14$ Hz; $J_{A,C} \cong 7$ Hz; $J_{C,X} \cong 3$ Hz. Letztere Kopplung wurde bei Zugabe von D_2O aufgehoben³⁾.

Das Massenspektrum zeigt das Molekel-Ion M bei m/e 204 und die Fragment-Ionen m/e 159 = $M - \cdot\text{CHS}$ und m/e 126 = $M - \text{CH}_2\text{S}_2$ ⁴⁾.

²⁾ Es bedeuten: Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl; DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid; AcM: Acetamidomethyl. Im Text wird zudem die von der «IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature» [4] empfohlene abgekürzte Schreibweise für Aminosäuren und Peptide verwendet.

³⁾ Das Spektrum wurde auf einem *Varian* HA-100D Spektrometer in einer Dimethylsulfoxid- d_6 -Lösung aufgenommen. Herrn Dr. *H. Fuhrer* danke ich für die Aufnahme und die Diskussion dieses Spektrums.

⁴⁾ Aufgenommen auf einem *Varian* Massenspektrometer Modell CH7, Direkteinlass, Proben-temperatur 140° . Für die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren bin ich Herrn Dr. *H. Hürzeler* zu Dank verpflichtet.

Über weitere spektroskopische und röntgen-kristallographische Untersuchungen von VI wird an anderer Stelle berichtet werden.

Experimentelles. – Die Smp. sind unkorrigiert. Sie wurden auf einem Apparat nach Dr. Tottoli (der Firma Büchi, Flawil) bestimmt; bei VI benutzte man den Apparat *Mel-Temp* (Laboratory Devices, Cambridge, Mass.).

HCl·H-Cys(Acm)-OMe (II). Zu 100 ml Methanol wurden unter Rühren bei -10° tropfenweise 7,9 ml (0,11 Mol) Thionylchlorid derart zugegeben, dass die Temperatur nie über -5° stieg. Man gab dann 22,8 g (0,1 Mol) *HCl·H-Cys(Acm)-OH* [I] zu und rührte noch 30 Min. bei -5° und 4 Std. bei 45° . Die klare Lösung wurde im Rotationsverdampfer bei 40° eingedampft und der Rückstand über Kaliumhydroxid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es resultierte ein dünn-schicht-chromatographisch⁵⁾ einheitlicher weisser Schaum (24,4 g).

Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-OMe (III). 29,65 g (122,5 mMol) *HCl·H-Cys(Acm)-OMe* (II) wurden in 400 ml Dimethylformamid unter Rühren mit 17,1 ml (122,5 mMol) Triäthylamin versetzt und dieses Gemisch zu der auf 0° gekühlten Suspension von 35,84 g (122,5 mMol) *Boc-Cys(Acm)-OH* (I) [1] und 27,8 g (134,8 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Nach 2 Std. bei 0° und 15 Std. bei 20° filtrierte man, dampfte das Filtrat bei $40^\circ/0,01$ Torr ein, nahm den Rückstand in 200 ml Chloroform auf und wusch die Lösung mit 0,1 N Salzsäure, 0,5 N Natriumhydrogencarbonat und Wasser. Der nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand, aus Essigester-Petroläther umkristallisiert, ergab 46,2 g (78%) III vom Smp. $96-98^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ ($c = 1,86$ in Methanol).

$C_{18}H_{32}N_4O_7S_2$	Ber. C 44,98	H 6,71	N 11,66	S 13,34%
(480,6)	Gef. „ 44,97	„ 6,57	„ 11,58	„ 13,28%

Boc-Cys-Cys-OMe (IV). Zu 6,35 g (25 mMol) Jod in 250 ml Methanol wurden unter starkem Rühren bei 20° 4,80 g (10 mMol) *Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-OMe* (III) in 150 ml Methanol innert 45 Min. getropft. Nach weiteren 45 Min. wurde auf 0° abgekühlt und 1 N Natriumthiosulfat zugegeben bis die Lösung nur noch schwach gelb war. Bei 35° engte man im Rotationsverdampfer auf ca. 50 ml ein, nahm in 500 ml Chloroform auf und wusch den Extrakt mit 0,1 N Natriumthiosulfat und Wasser. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat dampfte man ein und kristallisierte den Rückstand aus Chloroform-Petroläther. Es resultierten 2,82 g (84%) IV, Sinterpunkt 165° , Smp. $185-187^\circ$ (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = -65^\circ$ ($c = 1,87$ in Methanol). Molekulargewicht (vaporometrisch [6], in Methylenechlorid) : 336.

$C_{12}H_{20}N_2O_5S_2$	Ber. C 42,84	H 5,99	N 8,33	S 19,06%
(336,4)	Gef. „ 42,78	„ 6,05	„ 8,17	„ 19,06%

Cys-Cys (VI). 2,016 g (6 mMol) *Boc-Cys-Cys-OMe* (IV) wurden in 60 ml 98-proz. Ameisensäure 2 Std. bei 20° stehengelassen. Die klare Lösung wurde dann bei $40^\circ/0,01$ Torr eingedampft und der ölige Rückstand 4 Std. über Kaliumhydroxid bei 0,01 Torr getrocknet. Dann nahm man in 225 ml Methanol auf und liess $2\frac{1}{2}$ Std. bei 45° stehen, wobei VI auszukristallisieren begann. Es wurde im Rotationsverdampfer bei 35° auf ca. 30 ml eingengt, zur Vervollständigung der Kristallisation über Nacht bei 0° belassen und dann abgenutscht, wobei 830 mg (68%) VI resultierten. Zur Analyse kristallisierte man aus heissem Methanol. Das so erhaltene VI beginnt bei 250° zu sintern und ist bei 310° vollständig zersetzt. $[\alpha]_D^{20} = +310^\circ$ ($c = 1,0$ in Dimethylsulfoxid).

$C_6H_8N_2O_2S_2$	Ber. C 35,28	H 3,95	N 13,71	S 31,39%
(204,3)	Gef. „ 35,17	„ 4,06	„ 13,70	„ 31,41%

Den Herren *H. R. Keller* und *R. Eberle* danke ich für die wertvolle Mitarbeit im Labor. Die Mikroanalysen, Molekulargewichtsbestimmungen und optischen Drehungen verdanke ich unseren Speziallaboratorien (Leitung: Dr. *W. Padowetz* und Dr. *H. Hürzeler*).

⁵⁾ Rf = 0,60 auf Kieselgel-Fertigplatten SL254 der Firma *Antec*, Birsfelder. Fließmittel: Methanol.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkwalter & R. Hirschmann*, *Tetrahedron Letters* 1968, 3057.
- [2] *R. G. Denkwalter, D. F. Veber, F. W. Holly & R. Hirschmann*, *J. Amer. chem. Soc.* 91, 502 (1969).
- [3] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv.* 51, 2061 (1968).
- [4] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Tentative Rules, Abbreviated Designation of Amino Acid Derivatives and Polypeptides, *Biochim. biophysica Acta* 121, 1 (1966).
- [5] *M. Brenner & W. Huber*, *Helv.* 36, 1109 (1953).
- [6] *D. Wegmann, C. Tomlinson & W. Simon*, «Microchemical Journal Symposium Series», Vol. II, «Microchemical Techniques», S. 1069, University Park 1961, *N. D. Cheronis* ed., New York and London 1962.
- [7] *D. E. Nitecki, B. Halpern & J. W. Westley*, *J. org. Chemistry*, 33, 864 (1968).
- [8] *R. Schwyzler, B. Iselin, W. Rittel & P. Sieber*, *Helv.* 39, 872 (1956).

Erratum

Helv. 71, 683 (1971), mémoire n° 67 de *J. M. J. Tronchet & Mlle F. Perret*; lire dans tout l'article: «nitrilimine» au lieu de «azométhine-imine».

8th International IUPAC Symposium on the Chemistry of Natural Products

New Delhi, 6–12 February 1972

Ten plenary lectures and contributed papers on the following topics: (A) Alkaloids; (B) Polyphenolics; (C) Terpenoids and Steroids; (D) Macromolecules of Biological Interest (Proteins, Peptides, Nucleic Acids, etc.); (E) Carbohydrates, Lipids and Related Substances; (F) Other Topics in Natural Products Chemistry including Physical Methods of Structure Determination.

For contributed papers, an abstract and an application form (to be distributed with Circular 2) must reach the Secretary not later than 1 September 1971. For the Circular 1 with provisionnal application form and further information, please write to: Professor *S. Rangaswami*, Secretary, Symposium Committee, 8th IUPAC Symposium, Indian National Science Academy, Bahadur Shah Zafar Marg, New Delhi-1 (India).