

# **PROCEEDINGS**

of the

## **Symposium on Methods of Peptide Synthesis**

held at

Prague, September 1958

Special Issue of the

**COLLECTION**

**OF CZECHOSLOVAK CHEMICAL COMMUNICATIONS**

Volume 24 (1959)



## CONTENTS

Eröffnung des Symposiums; einige Bemerkungen zur Thematik der Peptidsynthese. <i>F. Šorm</i>	3
Aktivierung der Carboxylgruppe für Peptidsynthesen. <i>Th. Wieland</i>	6
Auf Aktivierung der Aminogruppe begründete Methoden der Knüpfung von Peptidbindungen. <i>St. Goldschmidt</i>	15
Diskussion zu den Referaten von Th. Wieland und St. Goldschmidt	26
Racemisation During Peptide Synthesis. <i>G. T. Young</i>	39
Discussion	46
Synthese optisch aktiver Peptide aus racemischen Aminosäureestern. <i>M. M. Botwinik</i>	54
Amino-Schutzgruppen. <i>E. Wünsch</i>	60
Diskussion	75
Carboxyl-Schutzgruppen; Diskussion	86
Special Problems in the Synthesis of Peptides from the Diamino-monocarboxylic and Monoamino-dicarboxylic Acids. <i>J. Rudinger</i>	95
Innermolekulare Transpeptidierung von Asparaginsäure und Glutaminsäure-Peptiden. <i>K. Medzihradszky</i>	107
Discussion on the papers presented by J. Rudinger and K. Medzihradszky	111
The Synthesis of Peptides Containing Cysteine: Special Problems. <i>G. T. Young</i>	114
Discussion	118
Peptide der Hydroxyaminosäuren; spezielle Probleme. <i>M. Brenner</i> und <i>A. Hartmann</i>	120
Diskussion	138
Über Peptide, die Reste von $\alpha$ -substituierten $\alpha$ -Aminosäuren enthalten. <i>M. M. Schemjakin</i>	143
Diskussion	147
Spezielle Probleme der Synthese cyclischer Peptide. <i>M. Rothe</i>	148
Diskussion	159

## PARTICIPANTS

- M. BRENNER, *Organisch-chemische Anstalt der Universität, Basel*  
I. ČERVENÁ, "*Léčiva*", *Prague*  
ST. GOLDSCHMIDT, *Organisch-chemisches Institut, Technische Hochschule, München*  
J. HONZL, *Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
K. JOŠT, "*Léčiva*", *Prague*  
B. LIBEREK, *Department of Organic Chemistry, Institute of Technology, Gdańsk*  
R. LUKEŠ, *Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*  
K. MEDZIHRADESKY, *Organisch-chemische Anstalt der Eötvös-Lorand-Universität, Budapest*  
Z. PÁDR, *Institute of Pharmacy and Biochemistry, Prague*  
K. PODUŠKA, *Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
Z. PRAVDA, *Institute of Epidemiology and Microbiology, Prague*  
M. PROTIVA, *Institute of Pharmacy and Biochemistry, Prague*  
M. ROTHE, *Institut für Faserstoff-Forschung, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Teltow-Seehof*  
J. RUDINGER, *Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
D. W. RUSSELL, *National Institute for Medical Research, London*  
T. SOKOŁOWSKA, *Department of Organic Chemistry, Institute of Technology, Gdańsk*  
F. ŠANTAVÝ, *Department of Medical Chemistry, Palacký University, Olomouc*  
M. M. SHEMYAKIN, *Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the U. S. S. R., Moscow*  
F. ŠORM, *Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
E. TASCHNER, *Department of Organic Chemistry, Institute of Technology, Gdańsk*  
T. VAJDA, *Organisch-chemische Anstalt der Eötvös-Lorand-Universität, Budapest*  
K. VEREŠ, *Biological Institute, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
O. WICHTERLE, *Institute of Macromolecular Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*  
TH. WIELAND, *Institut für organische Chemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main*  
E. WÜNSCH, *Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München*  
G. T. YOUNG, *The Dyson Perrins Laboratory, Oxford University*  
M. ZAORAL, *Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*

## ERÖFFNUNG DES SYMPOSIUMS; EINIGE BEMERKUNGEN ZUR THEMATIK DER PEPTIDSYNTHESE

F. ŠORM

*Chemisches Institut, Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften, Prag*

*Meine Damen und Herren,*

*es ist mir eine Freude, das von dem Chemischen Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften veranstaltete Symposium über Methoden der Peptidsynthese eröffnen zu können und ich heiße Sie im Namen der Leitung des Institutes sowie des Präsidiums der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften herzlich willkommen.*

Der Gegenstand des Symposiums — das Gebiet der Peptidsynthese — besitzt heute schon große theoretische sowie praktische Bedeutung und es besteht kein Zweifel darüber, daß diese Bedeutung in der Zukunft noch weiter zunehmen wird. Dieses Interesse geht darauf zurück, daß die Peptidverknüpfung der Aminosäuren die Grundlage des Aufbaus der wichtigsten natürlichen Makromoleküle — der Eiweißstoffe darstellt, insbesondere aber auf die Tatsache, daß eine Reihe von natürlichen Peptiden bedeutungsvolle physiologische Eigenschaften besitzt, welche nicht nur die Aufmerksamkeit der organischen Chemiker und Biochemiker fesseln, sondern auch die der wissenschaftlichen Arbeiter auf den verschiedensten Gebieten der biologischen Wissenschaften.

Das Hauptarbeitsgebiet in der Peptidsynthese zielt heute gerade in dieser Richtung. Dieser Impuls wurde durch die theoretische Bedeutung und den praktischen Erfolg der Oxytocin-Synthese erteilt. Man kann voraussetzen, daß bei dem heutigen methodischen Niveau auch die Synthesen komplizierterer biologisch aktiver Peptide realisierbar sind, so z. B. auch die Synthese der aktiven Grundstrukturen des adrenocorticotropen Hormons oder sogar des Insulins. Die Feststellung gegenseitiger struktureller Beziehungen zwischen Oxytocin und Vasopressin liefert weitere bedeutungsvolle Angriffspunkte für die Untersuchung der gegenseitigen Beziehungen zwischen der Struktur der Peptide und deren biologischer Aktivität. Diese Forschungsrichtung ist besonders anziehend, da sie nicht nur zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Hormone mit Peptidstruktur beitragen kann — welche, wie wir wissen, in äußerst geringen Dosen wirksam sind — sondern auch zu der Erkenntnis der Regulationsmechanismen des zentralen Nervensystemes.

Die synthetischen Arbeiten werden sich sicherlich nicht auf die Synthese der Hormone mit Peptidstruktur beschränken, sondern werden zweifellos in weit größerem Ausmaß als bisher auch die Antibiotika mit Peptidstruktur einbeziehen, wo die Erforschung der Beziehungen zwischen chemischem Aufbau auf der einen und der Toxizität für Mikro- und Makroorganismen auf der anderen Seite gleichfalls viele neue und auch vom praktischen Gesichtspunkt bedeutende Entdeckungen bringen kann.

Ich bin jedoch der Ansicht, daß es richtig sein wird, die synthetischen Arbeiten auch auf eine Reihe von höchst toxischen Peptiden auszudehnen, wie

dies die einfachen toxischen Prinzipie einiger Schwämme (Phalloidin, Amanitin) sind. Dies ist insbesondere mit dem Ziel der Aufklärung ihres Wirkungsmechanismus verknüpft, da es nicht ausgeschlossen ist, daß die extrem toxischen bakteriellen Toxine die Struktureinheiten toxischer Peptide oder analoge kleine toxophorische Strukturen enthalten.

Im Zusammenhang mit der Erforschung der Synthese biologisch bedeutungsvoller Peptidstrukturen wäre es sicherlich von Interesse, sich näher mit der Funktion der anomalen D-Aminosäuren in der Peptidkette vom Gesichtspunkt der physikalischen und biologischen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen zu befassen.

Ein weiteres breites Anwendungsgebiet der Peptidsynthese betrifft die Forschung auf dem Gebiet der Eiweißchemie. Die Peptidchemiker können hier insbesondere bei der Aufklärung der bisher wenig übersichtlichen Mechanismen der Proteosynthese und des Eiweißabbaus im lebenden Organismus mitwirken. Es wird insbesondere möglich sein, mit Hilfe der Synthese geeignet markierter Peptide die endgültige Entscheidung zu fällen, ob die Oligopeptide eine Zwischenstufe der Proteosynthese sind und ob bei der Resynthese der Eiweißstoffe im Organismus deren völlige Hydrolyse erfolgt oder nicht. Es ist selbstverständlich, daß diese Fragen nur in engster Zusammenarbeit mit Forschern auf dem Gebiet der Eiweißstruktur und der Proteosynthese gelöst werden können.

Die Arbeit auf dem Gebiet der Peptidsynthese könnte auch zur Aufklärung der Funktion der Struktur der aktiven Zentren von Enzymen in Beziehung zu den anderen Teilen des Eiweißmoleküls beitragen.

Große Bedeutung wird meiner Ansicht nach die Erforschung synthetischer Peptide im Zusammenhang mit dem Ernährungsproblem hinsichtlich des Eiweißstoffwechsels haben. Die Ergebnisse einer Reihe von Arbeiten zeigen nämlich, daß das Wachstum einiger Mikroorganismen durch Einwirkung bestimmter Faktoren von Peptidcharakter auch in Anwesenheit aller Aminosäuren charakteristisch beschleunigt werden kann. Auf das Vorhandensein ähnlicher Faktoren in der Ernährung des Menschen weisen auch gewisse Erfahrungen der Kliniker bei der Anwendung von Eiweißhydrolysaten hin. Diese Forschungsrichtung ist allerdings noch im Anfangsstadium und es ist natürlich notwendig, die aufgeworfenen Fragen zunächst auf dem Gebiet der Biologie zu lösen.

Falls die Peptid-Chemiker die ihnen durch den heutigen Stand der Wissenschaft gestellten Aufgaben erfolgreich bewältigen sollen — und diese Aufgaben sind nicht klein — muß die experimentell-methodische Seite ihres Fachgebietes wesentlich entwickelt werden. Sie wissen sicher alle gut, daß gerade Ihr Arbeitssektor methodisch äußerst schwierig ist, und dies einerseits wegen der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Peptide und andererseits wegen einer gewissen natürlichen Begrenztheit der brauchbaren Arbeitsmethoden. Ich bin überzeugt, daß es notwendig sein wird die methodische Seite der Peptidsynthese gerade in den folgenden zwei schwachen Punkten zu entwickeln. Erstens wird es nötig sein, die aus dem Charakter des verarbeiteten Materials hervorgehenden Schwierigkeiten zu überwinden. Dies müßte durch konsequente Bemühungen um die Verbesserung der Isolations-, Reinigungs- und Identifizierungsmethoden unter Anwendung moderner Trennverfahren geschehen, welche gerade auf diesem Gebiet gut entwickelt sind. Bedauerlicherweise widmen die Peptid-Chemiker erfahrungsgemäß gerade

*Eröffnung des Symposiums*

diesen Fragen recht wenig Aufmerksamkeit. Ebenso muß der weiteren Entwicklung der eigentlichen synthetischen Methoden und insbesondere der Suche nach prinzipiell neuen Methoden erhöhtes Augenmerk gewidmet werden.

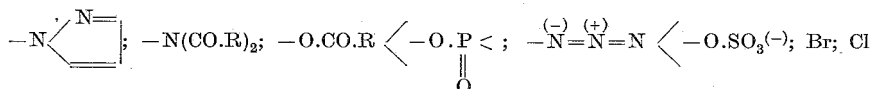
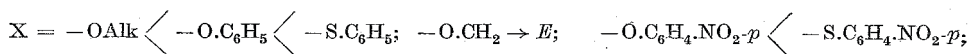
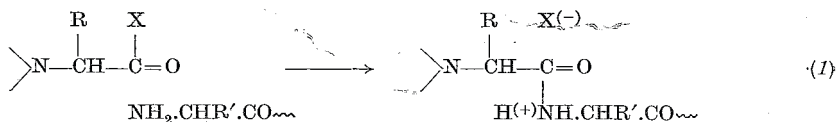
Ich möchte nun diese kurze Einleitung schließen, in welcher ich versuchte, Ihnen die Problematik zu erläutern, der ich selbst ziemlich nahe stehe, und wünsche Ihnen weiteren Verhandlungen recht viel Erfolg.

## AKTIVIERUNG DER CARBOXYLGRUPPE FÜR PEPTIDSYNTHESEN\*

TH. WIELAND

*Institut für organische Chemie, Universität Frankfurt a. M.*

Die Verknüpfung einer Aminosäure oder eines Peptids mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure oder eines zweiten Peptids erfordert, als Acylierungsreaktion, die Überführung der reaktionsträgen Carboxylgruppe in einen reaktionsfähigen Zustand. Es ist zwar möglich, die Amidbindung aus Carbonsäure und Amin zu erhalten (z. B. Acetamid aus Ammoniumacetat), doch ist hierfür hohe Temperatur und Abdestillieren des Kondensationswassers nötig, drastische Bedingungen also, unter denen bei Peptidsynthesen Zersetzung eintreten kann.\*\* Die einzigen Carbonsäuren, die mit Aminen unter relativ milden Bedingungen reagieren, sind Kohlensäure oder Ameisensäure, alle anderen und auch die Komponenten der Peptidsynthese müssen „aktiviert“ werden. Man erreicht dies durch Anknüpfung von verschiedenen Gruppen an den Carboxylkohlenstoff, die durch ihre elektronenanziehende Wirkung seine elektrophilen Eigenschaften mehr oder weniger stark erhöhen (I). In der nachfolgenden Zusammenstellung ist versucht, einige aktivierende Reste X mit zunehmend aktivierender Wirkung anzuordnen.



Präparativ werden bisher fast ausschließlich acylierende Komponenten benutzt, deren Aminogruppen durch eine nachträglich leicht abspaltbare Schutzgruppe besetzt sind (vgl. die Ausführungen von Dr. E. Wunsch, S. 60). Die lebende Zelle scheint bei der Peptidsynthese mit „freien“ Aminoacylen zu arbeiten, sodaß den aktivierenden Aminosäuren mit freier Aminogruppe (meist in Form von  $\text{R}-\overset{(+)}{\text{N}}\text{H}_3$ ) ein immer steigendes Interesse zukommen wird. Über den ebenfalls oft notwendigen reversiblen Schutz der Carboxylgruppe an der zu acylierenden Komponente, meist als Ester, wird von Prof. E. Taschner berichtet.

\* Neuere Übersichten siehe<sup>1-3</sup>.

\*\* Über eine Copolymerisation sämtlicher Aminosäuren zu nicht dialysierbaren Polypeptiden durch dreistündiges Erhitzen auf 170° in einer Glutaminsäure-(Pyrrolidoncarbonsäure)-schmelze haben vor kurzem S. W. Fox und K. Harada [Science 128, 1214 (1958)] berichtet.

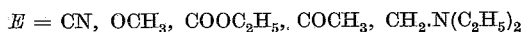
## I. Alkylester

Aminosäurealkylester sind die am frühesten erhaltenen aktivierten Aminosäurederivate, und zwar sowohl mit freier Aminogruppe<sup>4</sup> als auch mit N-acylierten<sup>4,5</sup>. Die ersteren reagieren beim Erhitzen oder in Gegenwart von Chymotrypsin<sup>6</sup> unter Alkoholabspaltung mit ihresgleichen zu Oligopeptidestern („Biuretbase“, d. h. Tetraglycinmethylester<sup>5</sup>), Tripeptidester zu Polypeptidestern (neue Literatur z. B. in<sup>7</sup>). N-Carbäthoxyglycyl-glycinmethylester gab z. B. mit Leucinmethylester den Tripeptidester<sup>4</sup>.

Die Darstellung der Ester freier Aminosäuren erfolgt entweder nach Curtius<sup>8</sup> aus den Aminosäuren in Alkohol mit Chlorwasserstoff oder Thionylchlorid<sup>9</sup> oder aus den Aminosäurechlorid-hydrochloriden (s. u.) durch Auflösung im entsprechenden Alkohol<sup>10</sup> oder aus den Leuchs'schen Anhydriden (s. u.) mit Alkoholen<sup>11</sup>. Benzylester entstehen aus Aminosäuren und Benzylalkohol mit Benzolsulfonsäure<sup>12,13</sup> oder Polyphosphorsäure<sup>14</sup> als Katalysator.

## II. Aktivierte Ester<sup>15</sup>

Die Reaktionsfähigkeit der Alkylester kann nach Schwyzer durch Einführung elektronenanziehender Gruppen (*E*) an den  $\alpha$ -Kohlenstoff stark gesteigert werden. Als solche wurden folgende, etwa in abnehmender Reihenfolge ihrer Wirkung angeordnete, untersucht:



Die Darstellung erfolgt aus den N-acylierten Aminosäuren und den entsprechenden Halogenmethylverbindungen durch Erhitzen mit einer tertiären Base in Essigester. Am besten haben sich die Cyanmethylester (*E* = CN) bewährt<sup>16</sup>.

Als aktivierte Ester sind auch die in neuester Zeit als vermutliche Zwischenprodukte bei der biologischen Proteinsynthese erachteten 2'- oder 3'-Aminosäureester am Riboseteil der Adenylsäure von Ribonucleinsäuren<sup>17</sup>, die Adenylester, zu bezeichnen. Sie geben mit Hydroxylamin überraschend leicht Hydroxamsäuren, mit Cysteamin Cysteamide<sup>18,19</sup>. Man erhält die Ester der Adenosin-5'-phosphorsäure direkt aus dem Nucleotid und Aminoacylthiophenol oder aus dem Adenylsäure-aminosäureanhydrid (s. u.) beim Erhitzen.

## III. Aminoacyl-(peptidyl)-phenole und -thiophenole<sup>20</sup>

Man arbeitet mit Thiophenol, *p*-Nitrothiophenol, *p*-Nitrophenol und 2,4-Dinitrophenol. Allgemeine Darstellungsmethoden der N-acetylierten Verbindungen sind die folgenden:

### 1. Von Aminosäuren

a) nach der Methode der gemischten Anhydride mit Alkylkohlsäuren (s. V) oder Dichlorphosphorsäuren (s. VI), die in Gegenwart einer tertiären Base (Trimethylamin, Pyridin) mit den entsprechenden Phenolen oder Thiophenolen umgesetzt werden, z. B. nach (2). Auch die Chloride eignen sich als Acylierungskomponenten<sup>21</sup>; b) aus denselben Komponenten mit Dicyclohexylcarbodiimid (s. VII) als Kondensationsmittel<sup>22,23</sup>; c) aus Acylaminosäure

Wieland:

und dem Schwefligsäureester<sup>24</sup> [OS(OAr)<sub>2</sub>] oder dem Phosphorigsäureester<sup>24</sup> [P(SAr)<sub>3</sub>] nach (3).

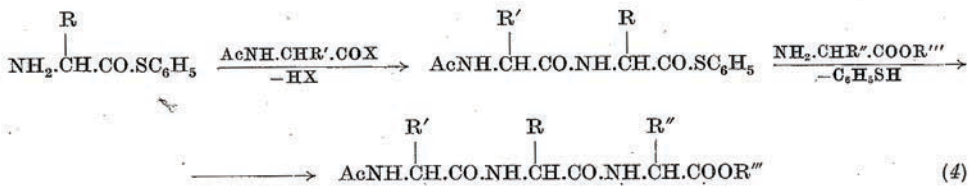


Y = O oder S



## 2. Von Peptiden

a) nach einer der drei unter III, 1. genannten Methoden; b) freie Aminoacyl- oder Peptidylthiophenole oder -4-nitrophenole lassen sich an ihrer Aminogruppe nach dem Anhydridverfahren<sup>20</sup> um eine Aminosäureeinheit verlängern (4), wodurch man aktivierte Peptide erhält, die an ihrer Carboxylgruppe weiter umgesetzt werden können.



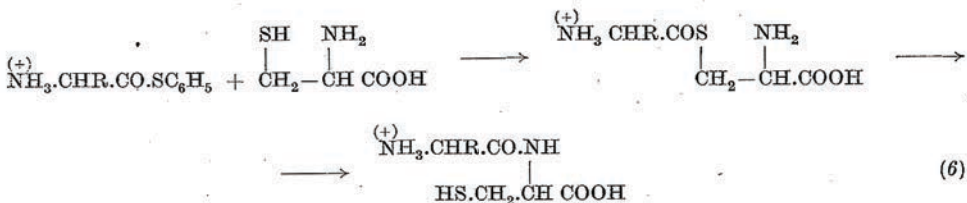
Die Thiophenylverbindungen zeichnen sich durch schwere Hydrolysierbarkeit bei leichter Aminolysierbarkeit (Peptidsynthese) aus und können deshalb, ohne Racemisierung, im wäßrigen Lösungsmittel verwendet werden.

Die entsprechenden aktivierten Aminosäuren mit freier Aminogruppe können aus obigen mit Bromwasserstoff-Eisessig gewonnen werden, wenn die Carboxygruppe als Schutzgruppe verwendet wurde (z. B.<sup>26</sup>). Man erhält diejenigen mit Thiophenol auch nach einem älteren Verfahren, nämlich aus den Aminosäure- (oder Peptid-) -chlorid-hydrochloriden und Thiophenol<sup>27</sup>.

Durch Aminoacylübertragung aus diesen Verbindungen auf andere Mercaptane sind deren S-Aminoacylderivate zugänglich, z. B. S-Alanylglutathion<sup>28</sup> nach (5). Wird als aliphatisches Mercaptan, in Wasser bei Zimmertemperatur, Cystein eingesetzt, so erfolgt dieselbe Übertragung zu einem S-Aminoacylcystein, das sich aber sehr rasch unter Acylwanderung zur N-Acylverbindung, dem Peptid, umlagert<sup>29</sup> (6) (Peptidsynthese unter zellmöglichen Bedingungen!).



GSH = Glutathion

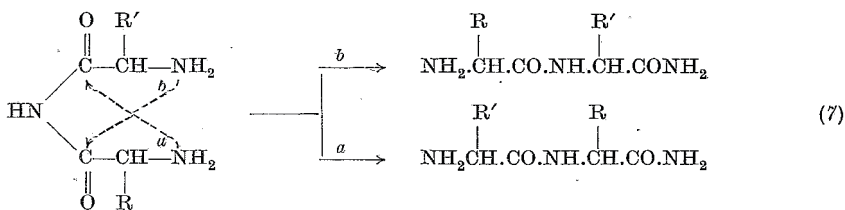


Über die Bildungsweise von Aminoacylmercaptanen aus Glyoxalen, Ammoniak und Mercaptan durch aminierende Cannizzaro-Reaktion s.<sup>30</sup>.

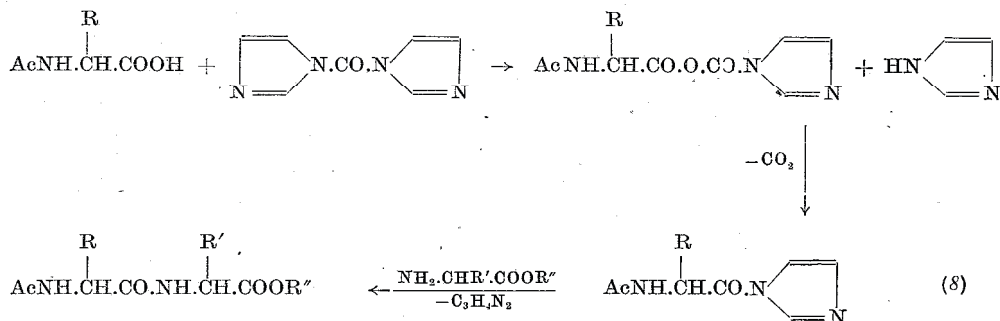
#### IV. Aktivierte Amide

Bis vor kurzem hat diese Klasse der aktivierten Aminosäuren mehr theoretische Interesse erregt mit Ausnahme der N-Tosylpyrrolidonverbindungen, über die an anderer Stelle berichtet wird (S. 29, 70, 81).

In Diaminoacylimiden sind beide Aminoacylreste energiereich gebunden. Sie sind nur als Di-hydrogensalze beständig, die man aus Diazidoacylimiden durch Reduktion mit Wasserstoff und Platinkatalysator<sup>31</sup> oder mit Bromwasserstoff-Eisessig (als Hydrobromide) kristallisiert erhält<sup>32</sup>. Schon bei pH 7 erfolgt sehr rasche intramolekulare Aminoacylierung (Peptidsynthese) nach (7).



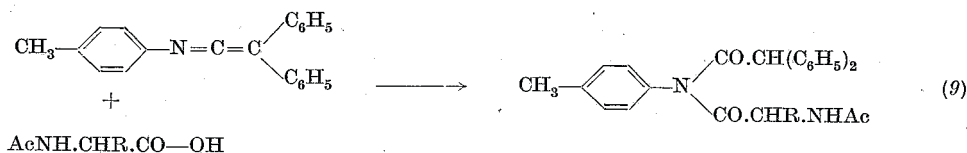
1953 wurde vom Vortragenden gezeigt<sup>33</sup>, daß N-Aminoacylderivate des Imidazolrings als aktivierte Aminosäuren zur Peptidverknüpfung dienen können, doch lieferte die Synthese dieser Verbindungen nur geringe Ausbeuten. Die Schwierigkeiten der Synthese konnten jetzt von Anderson und Paul\* überwunden werden. Sie zeigten, daß N,N'-Carbonyl-diimidazol<sup>34</sup> mit N-Acyloaminosäure bei Zimmertemperatur unter Kohlendioxyd-Entwicklung zum aktivierten Amid reagiert, das ohne Isolierung mit Estern oder Anionen zweiter Aminosäuren oder Peptiden mit guten Ausbeuten ohne Racemisierung zu Peptiden reagiert (8).



Auch die aus Diphenylketen-*p*-tolylimid und Acylaminosäuren nach (9) erhältlichen Aminoacylimide übertragen ihren Aminosäurerest auf den Stickstoff zweiter Aminosäuren oder Peptidester<sup>35</sup>.

\* J. Am. Chem. Soc. 80, 4423 (1958); die Arbeit kam erst nach dem Symposium zur Kenntnis des Autors.

Wieland



## V. Anhydride mit organischen Säuren

Gemischte Anhydride von N-Acylaminosäuren und N-Acylpeptiden mit organischen Säuren sind erstmalig von Wieland und Sehring<sup>36</sup> aus den Aminosäuren und Acylehloriden in Gegenwart einer tertiären Base dargestellt und für Peptidsynthesen verwandt worden. Kurz darauf erwiesen sich die entsprechenden Verbindungen aus Acylaminokomponenten und Chlorameisensäureestern als besonders einfach herzustellende Acylierungskomponenten<sup>37-39</sup>. Ein eingehendes Studium weiterer Hilfssäuren unternahmen Vaughan und Osato<sup>40</sup>. Im Prinzip haben sich alle diese Anhydride bisher gut bewährt, doch ist bei ihrer Verwendung besonders sorgfältig auf Racemisierung zu achten, die in Tetrahydrofuran bei tiefer Temperatur auszubleiben scheint. Bei der großen Zahl der Anwendungen muß hier auf eine Einzelaufzählung verzichtet werden.

## VI. Anhydride mit anorganischen Säuren

Hierzu gehören die „klassischen“ *Azide*, die heute noch vielfach zu Peptidsynthesen herangezogen werden, da sie besonders wenig Racemisierung zu verursachen scheinen. Die für ihre Darstellung benötigten Hydrazide kann man, außer aus den Estern, mit besonders guter Ausbeute aus den Thioestern (s. III) und Hydrazin gewinnen<sup>20</sup>.

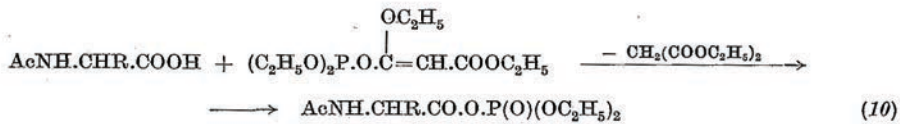
Auch die *Chloride*, besonders reaktionsfähige Verbindungen, gehören zu den am längsten bekannten Aminosäurederivaten. Sie sind einige der wenigen derartigen Derivate, die ohne Acylschutz der Aminogruppe direkt dargestellt werden können (alte Methode von E. Fischer aus trockenen, fein gepulverten Aminosäuren mit Phosphorpentachlorid in Acetylchlorid<sup>41</sup>), neuerdings in Chloroform (eigene Versuche) oder in Tetrachlormethan<sup>42</sup> oder aus Leuchs'schen Anhydriden mit Chlorwasserstoff oder Bromwasserstoff<sup>43</sup>. Dabei fallen die entsprechenden Hydrohalogenide an, die zur Darstellung der Ester oder Thiophenylverbindungen<sup>27</sup> dienen können. Wegen ihrer zu großen Reaktionsfähigkeit finden die Chloride der ungeschützten Aminosäuren und auch die der N-acylierten keine verbreitete Anwendung.

Die Halbanhydride der *Schwefelsäure*  $\text{-NH}\cdot\text{CHR}\cdot\text{CO}\cdot\text{O}\cdot\text{SO}_3^{(-)}$  lassen sich nach Kenner aus N-Acylaminosäuren (oder Peptiden) mit Schwefeltrioxyd in Dimethylformamid bei tiefer Temperatur herstellen und sofort mit Aminosäurekomponenten umsetzen<sup>44</sup>. Dabei tritt bemerkenswert wenig Racemisierung ein.

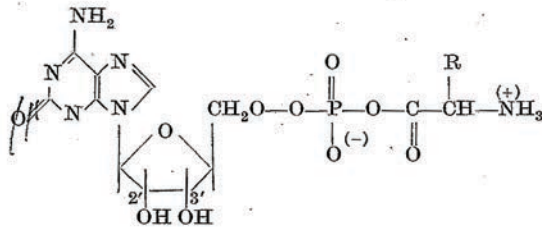
Anhydride von Aminosäuren mit *Phosphorsäure* oder ihren Estern haben von jeher besonders wegen ihrer vermutlichen biochemischen Rolle die Aufmerksamkeit erregt. Ältere Versuche und Ergebnisse findet man in den zitierten Zusammenfassungen<sup>1-3</sup>. Aus der letzten Zeit zu erwähnen sind die im Laboratorium des Vortragenden angestellten Versuche mit Phosphoroxychlorid<sup>45</sup> als Hilfsschlorid, das mit N-Acylaminosäuren oder -peptiden in Pyridin bei  $-15^\circ$  gemischte Anhydride  $\text{R}\cdot\text{CO}\cdot\text{O}\cdot\text{POCl}_2$  gibt, die bei Zimmertemperatur

### Aktivierung der Carboxylgruppe

mit einer gleichzeitig anwesenden Aminokomponente mit guter Ausbeute und ohne nennenswerte Racemisierung zum Peptid reagieren (Phosphoroxchlorid-Methode). Aus allerletzter Zeit stammt weiterhin die Peptidsynthese mit Diäthylphosphorsäureanhydriden acylierter Aminosäuren, die nach (10) mit Hilfe des substituierten Enolphosphats [Phosphorsäure-diäthylester-( $\alpha$ -äthoxy- $\beta$ -carbäthoxy-vinylester)] durch Cramer<sup>46</sup> gewonnen wurden.



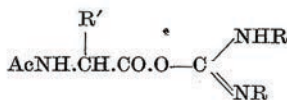
Die biologisch interessanten Adenylsäure-aminosäureanhydride (I), also Verbindungen mit ungeschütztem Stickstoff, spielen für präparative Synthesen wegen ihrer schweren Zugänglichkeit keine Rolle. Man erhält sie unter Verwendung von Carbodiimiden (s. u.) aus Adenosin-5'-phosphorsäure und  $\alpha$ -Azidosäuren oder Carbobenzoxy-aminosäuren<sup>47</sup> und nachträglicher Reduktion der gebildeten Anhydride. Auch aus Adenosin-monophosphat und freien Aminosäuren können sie mit demselben Kondensationsmittel synthetisiert werden<sup>48</sup>. Beim Erwärmen im indifferenten Lösungsmittel lagern sie sich, wohl in intramolekularer Reaktion, zu den unter II. erwähnten Adenylestern an 2'- oder 3'-OH um.



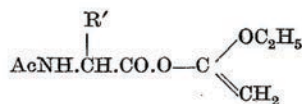
I

### VII. Carbodiimid-Methode; Acetylen-Methode

Das erst vor kurzen in die Peptidchemie von Sheehan eingeführte Dicyclohexylcarbodiimid<sup>49</sup> hat sich als Kondensationsmittel an vielen Stellen sehr gut bewährt. Eigene Erfahrungen liegen bei der unter VI. genannten Aminosäure-adenylsäureanhydridsynthese sowie für die Cyclisierung von Peptiden vor<sup>50</sup>. Hierbei scheint die Anwesenheit eines Amino-endständigen, sterisch am wenigsten wirksamen, Glycinrests die Reaktion zu begünstigen.



II



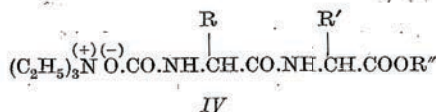
III

Die Carbodiimidkondensation verläuft sicher über einen aktiven O-Isoharnstoffester II, so daß man sie als Aktivierung der Carboxylgruppe bezeich-

nen muß. Dasselbe gilt für die von Arens<sup>51</sup> angegebene Verwendung von Alkoxyacetylenen, bei denen kürzlich aus Phthalylglycin und Äthoxyacetylen im wäßrigen Medium von Sheehan ein aktives Enolanhydrid (analog *III*) isoliert werden konnte<sup>52</sup>. Eigene Bestrebungen, Addukte von Carbonsäuren und Rhodaniden herzustellen, denen dieselbe Reaktionsfähigkeit zukommen müßte, sind bisher gescheitert.

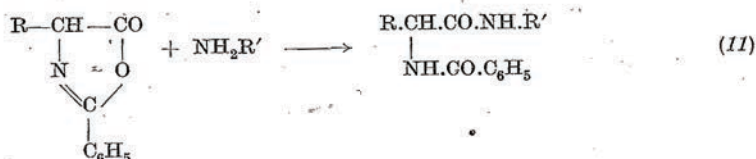
### VIII. Cyclische, energiereiche Aminosäurederivate

Die am längsten bekannten Derivate dieser Art sind die von Leuchs schon 1903 beschriebenen inneren N-Carbaminsäure-anhydride der  $\alpha$ -Aminosäuren, die heute als Monomere für die Herstellung hochmolekularer Makropeptide in weiten Kreisen angewandt werden<sup>53</sup>. Eine von Bailey<sup>54</sup> ausgearbeitete Anwendung dieser Verbindungen zur planvollen Synthese niederer Peptide, die in ihrer Umsetzung mit Aminosäureestern in Gegenwart von Triäthylamin besteht, wobei der Peptidester als Triäthylammoniumsalz des Carbaminats (*IV*) abgefangen wird, ist weiter ausgearbeitet worden<sup>55</sup>.



Die Synthese der Leuchs'schen Anhydride kann erfolgen: *a*) aus Aminosäuren und Phosgen<sup>56</sup>; *b*) aus Carbaldehydaminosäurehalogeniden durch Erwärmen (am leichtesten reagieren N-Carbobenzyloxyaminosäure-bromide<sup>57</sup>); *c*) durch Zersetzung der Halbazine substituierter Malonsäuren<sup>58</sup> und *d*) aus den Dinatrium-salzen von Aminosäure-carbaminsäuren und Kohlendioxyd. Ihre Verwendung zur Synthese von Estern und Chloriden wurde oben genannt. Mit Schwefelwasserstoff geben sie in guter Ausbeute Aminothiosäuren.

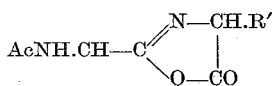
Die ebenfalls für Peptidsynthesen brauchbaren Oxazolidone (Azlactone) haben den Nachteil, daß sie sich nur aus N-Acylaminosäuren herstellen lassen (z. B. Benzoyl), deren Acylrest sich nach erfolgter Peptidsynthese (*II*) nicht mehr schonend abspalten läßt. Azlactone von N-Acyl-dipeptiden (*V*), die vielleicht brauchbarer wären, sind neuerdings von King und Mitarbeitern<sup>60</sup> beschrieben worden. Es ist allerdings zu bemerken, daß bei der Azlactonisierung regelmäßig Racemisierung eintritt, was den Wert solcher Synthesen mindert.



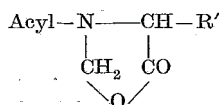
Als neue cyclische Derivate mit den Eigenschaften von Azlactonen sind die „Lactone“ — N-Acyl-oxazolidinone (*VI*) — für Peptidsynthesen vorgeschlagen worden<sup>61,62</sup>. Man gewinnt sie aus den Acylaminosäuren und Paraformaldehyd in Benzol bei Gegenwart von etwas *p*-Toluolsulfonsäure in der Wärme oder im Falle der Tosylverbindungen<sup>62</sup> aus Tosylaminosäuren und Formaldehyd

### Aktivierung der Carboxygruppe

in Eisessig-Acetanhydrid durch längeres Erhitzen. Sie reagieren mit den Estern zweiter Aminosäuren zu Acyldipeptidestern. Die Anwendungsbreite und Racemisierungsfrage ist hierbei noch nicht genau untersucht.



V



VI

Die Tendenz in der Chemie der Peptidsynthesen geht nach Ansicht des Vortragenden dahin gute Lösungsmittel zu finden, die auch den Umsatz höherer Peptidderivate nach den oben genannten Methoden zulassen, womöglich in Wasser, als dem natürlichen Lösungsmittel der Peptide zu arbeiten, die Racemisierung zu vermeiden um so Polypeptide definierter Bausteinanordnung zu gewinnen. Zur gewollten Kettenfaltung, die die sekundäre und tertiäre Struktur von Proteinen bewirkt, sind bisher noch keine Methoden vorhanden.

### Literatur

1. Wieland T.: *Angew. Chem.* 63, 7 (1951); 66, 507 (1954); Wieland T., Heinke B.: *Angew. Chem.* 69, 362 (1957).
2. Grassmann W., Wünsch E.: *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 13, 444 (1956).
3. Goodman M., Kenner G. W.: *Advances in Protein Chem.* 12, 466 (1957).
4. Fischer E.: *Ber.* 39, 530 (1906).
5. Curtius T.: *J. prakt. Chem.* 70, 57 (1904).
6. Brenner M., Müller H. R., Pfister R. W.: *Helv. Chim. Acta* 33, 568 (1950).
7. Brunn-Leube J. v., Schramm G.: *Chem. Ber.* 89, 2045 (1956).
8. Curtius T., Goebel F.: *J. prakt. Chem.* 37, 150 (1888).
9. Brenner M., Huber W.: *Helv. Chim. Acta* 36, 1109 (1953).
10. Kuhn R., Wieland T.: *Ber.* 73, 972 (1940).
11. Bergmann M., Zervas L., Ross W. F.: *J. Biol. Chem.* 111, 245 (1935).
12. Miller H. K., Waelsch H.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1092 (1952).
13. Ciperia J. D., Nicholls R. V. V.: *Chem. & Ind. (London)* 1955, 16.
14. Erlanger B. F., Hall R. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5781 (1954).
15. Schwyzer R., Iselin B., Feurer M.: *Helv. Chim. Acta* 38, 69 (1955).
16. Schwyzer R., Feurer M., Iselin B.: *Helv. Chim. Acta* 38, 83 (1955).
17. Hoagland M. B.: *Reprint No. 2 des Symposiums VLII, IV. intern. Kongreß f. Biochemie, Wien 1958.*
18. Wieland T., Niemann E., Pfeleiderer G.: *Angew. Chem.* 68, 305 (1956).
19. Wieland T., Jaenicke F., Merz H., Ossorio M.: *Ann.* 613, 95 (1958).
20. Wieland T., Heinke B.: *Ann.* 615, 184 (1958).
21. Bodánszky M.: *Nature* 175, 685 (1955); Bodánszky M., Szelke M., Tömörkény E., Weisz E.: *Chem. & Ind. (London)* 1955, 1517.
22. Elliott D. F., Russell D. W.: *Biochem. J.* 66, 49P (1957).
23. Rothe M., Kunitz F. W.: *Angew. Chem.* 68, 414 (1956); *Ann.* 609, 88 (1957).
24. Iselin B., Rittel W., Sieber P., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 40, 373 (1957).
25. Farrington J. A., Hextall P. J., Kenner G. W., Turner J. M.: *J. Chem. Soc.* 1957, 1407.
26. Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 37, 647 (1954).
27. Wieland T., Schäfer W.: *Ann.* 576, 104 (1952).
28. Wieland T., Pfeleiderer G., Lau H. H.: *Biochem. Z.* 327, 393 (1956).
29. Wieland T., Bokelmann E., Bauer L., Lang H. U., Lau H.: *Ann.* 583, 129 (1953).
30. Wieland T., Franz J., Pfeleiderer G.: *Chem. Ber.* 88, 641 (1955).
31. Wieland T., Mohr H.: *Ann.* 599, 222 (1956).
32. Wieland T., Urbach H.: *Ann.* 613, 84 (1958).
33. Wieland T., Schneider G.: *Ann.* 580, 159 (1953).

Wieland

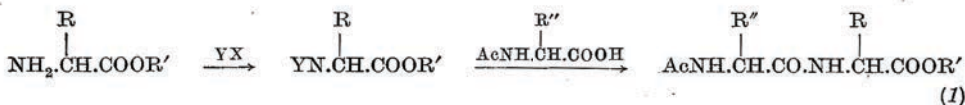
34. Staab H. A.: *Ann.* 609, 75 (1957).
35. Stevens C. L., Munk M. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 4068 (1958).
36. Wieland T., Sehring R.: *Ann.* 569, 117 (1950).
37. Wieland T., Bernhard H.: *Ann.* 472, 190 (1952).
38. Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* 34, 874 (1951).
39. Vaughan J. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3547 (1951).
40. Vaughan J. R., Osato R. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 5553 (1951).
41. Fischer E.: *Ber.* 38, 605 (1905).
42. Levine S.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1382 (1954).
43. Brenner M., Photaki I.: *Helv. Chim. Acta* 39, 1525 (1956).
44. Kenner G. W., Stedman R. I.: *J. Chem. Soc.* 1952, 2069.
45. Wieland T., Heinke B.: *Ann.* 599, 70 (1956).
46. Cramer F., Gärtner K.-G.: *Chem. Ber.* 91, 1562 (1958).
47. Karasek M. A., Castelfranco P., Meister A.: *Federation Proc.* 17, 996 (1958); Castelfranco P., Moldave K., Meister A.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2335 (1958).
48. Berg P.: *J. Biol. Chem.* 233, 608 (1958).
49. Sheehan J. C., Hess G. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067 (1945).
50. Wieland T., Ohly K. W.: *Ann.* 605, 179 (1957).
51. Arens J. F.: *Rec. trav. chim.* 74, 769 (1955).
52. Sheehan J. C., Hlavka J. H.: *J. Org. Chem.* 23, 635 (1958).
53. Bamford C. H., Elliot A., Hanby W. E.: *Synthetic Polypeptides*. Academic Press, New York 1956.
54. Bailey J. L.: *Nature* 164, 889 (1949).
55. Langenbeck W., Kresse P.: *J. prakt. Chem.* 274, 261 (1955).
56. Farthing A. C.: *J. Chem. Soc.* 1950, 3213.
57. Ben-Ishai D., Katchalski E.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3688 (1952).
58. Curtius T., Sieber W.: *Ber.* 55, 1543 (1922).
59. Wieland T., Euler K. E.: *Chem. Ber.* 91, 2305 (1958).
60. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R., Swindin W. A.: *J. Chem. Soc.* 1957, 873.
61. Ben-Ishai D.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5736 (1957).
62. Micheel F., Thomas S.: *Chem. Ber.* 90, 2906 (1957).

# AUF AKTIVIERUNG DER AMINOGRUPPE BEGRÜNDETE METHODEN DER KNÜPFUNG VON PEPTIDBINDUNGEN

ST. GOLDSCHMIDT

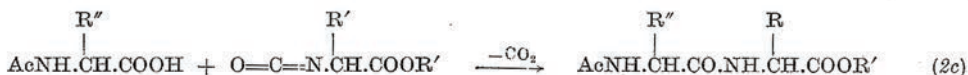
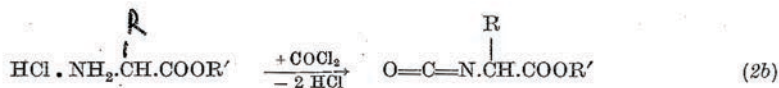
*Organisch-chemisches Institut, Technische Hochschule, München*

Die Verknüpfung von zwei oder mehreren Molekülen gleicher oder verschiedener Aminosäuren zu Peptiden entspricht der Bildung von Säureamiden. Im Prinzip sollte daher zur Peptidsynthese jede Methode brauchbar sein, die zu Säureamiden führt, was jedoch infolge der besonderen Eigenschaften der Peptide nur beschränkt der Fall ist. So erweist sich die direkte Bindung zwischen freien Aminosäuren unter milden Bedingungen als unmöglich. Man ist deshalb gezwungen, eine der beiden reaktionsfähigen Gruppen der Aminosäuren bzw. Peptide, d. h. entweder die freie Carboxylgruppe oder die freie Aminogruppe eines der eingesetzten Moleküle zu aktivieren. Über Methoden, die zur Aktivierung der Carboxylgruppe Verwendung gefunden haben, hat Herr Wieland berichtet. Im folgenden sollen nun Methoden besprochen werden, bei denen die Knüpfung einer Peptidbindung nach (I) auf einer Aktivierung der Aminogruppe beruht.



## Verwendung von N-Carbonylamino-säureestern

N-Carbonylamino-säureester lassen sich in einfacher Weise darstellen, wenn man unter Ausschluß von Feuchtigkeit auf Aminosäureester bzw. ihre Hydrochloride Phosgen in siedendem Toluol einwirken läßt<sup>1</sup> (2b). Wir haben eine größere Zahl dieser Ester hergestellt<sup>2,3</sup> (Tab. I). Sie fallen in ausgezeichneten Ausbeuten an (90%), bei Einsatz optisch-aktiver Aminosäureester bleibt die optische Aktivität erhalten. Bei Feuchtigkeitsausschluß sind die Ester unbeschränkt haltbar und neigen nicht wie andere Isocyanate zur Polymerisation.



Die Verwendung der N-Carbonylamino-säureester zur Peptidsynthese ergibt sich auf Grund einer alten Mitteilung von Wurtz<sup>4</sup>, der zufolge Isocyanate mit Carbonsäuren unter Bildung von Säureamiden reagieren (2a). Diese eigenartige Reaktion verläuft, wie später gezeigt wurde, offenbar über instabile Anhydride, die meistens unter Kohlendioxyd-Abspaltung in Säureamide übergehen.

Tabelle I.  
N-Carbonyl-aminosäure-ester<sup>3</sup>

Aminosäure	N-Carbonyl-aminosäure-äthylester	
	Sdp., °C/mm	Ausb., %
DL-Ala	69/11	85–91
DL- $\alpha$ -Aminobuttersäure	81/13	92–96
$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	61,5/12	94
DL-Norval	94/14	97,5
DL-Val	87/11	92–94
DL-Leu	97/11	94–95
L-Leu	104,5/15 <sup>b</sup>	91,5
DL-Phegly	127/12	95
DL-Phe	152/10	90–94
L-Cy(SBz)	162/0,8 <sup>c</sup>	91
DL-Met	155/24	97
L-Asp <sup>a</sup>	130/10 <sup>d</sup>	89–91
L-Glu <sup>a</sup>	151/10 <sup>e</sup>	92

<sup>a</sup> Diäthylester; <sup>b</sup>  $[\alpha]_D^{20} - 22,4^\circ$ ; <sup>c</sup>  $[\alpha]_D^{18} - 41,9^\circ$ ; <sup>d</sup>  $[\alpha]_D^{24} - 34,5^\circ$ ; <sup>e</sup>  $[\alpha]_D^{27} - 46,3^\circ$  (Drehungen in Substanz).

Tabelle II  
Peptide über N-Carbonyl-aminosäure-ester<sup>3</sup>

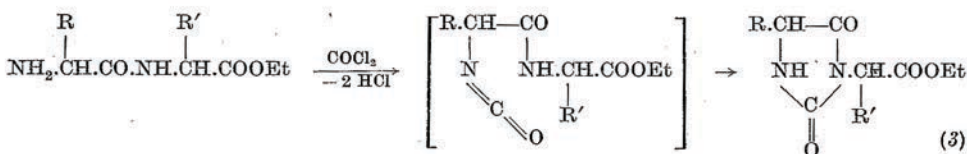
Cbz-Peptid-äthylester	Ausb., %
Dipeptide	
-Gly-Gly-	96
-DL-Ala-Gly-	91
-Gly-DL-Ala-	94
-Gly-DL-Leu	94
-Gly-DL-Phegly-	94
-Gly-DL-Val-	95
-Gly-L-Cy(SBz)- <sup>b</sup>	90
Tripeptide <sup>a</sup>	
-Gly-Gly Gly-	95
-Gly-DL-Ala Gly-	87
-L-Glu (Gly-) Gly- <sup>c</sup>	95
Tetrapeptid	
-Gly-Gly-Gly Gly-	95

<sup>a</sup> In dieser sowie den weiteren Tabellen zeigt der Strich den Ort der Knüpfung der Peptidbindung an. <sup>b</sup>  $[\alpha]_D^{20} - 45,9^\circ$  (Methanol). <sup>c</sup> Diäthylester;  $[\alpha]_D^{20} - 27,8^\circ$  (Aceton).

Die Übertragung dieser Reaktion auf die Peptidsynthese bedeutet den Umsatz eines N-Carbonylamino-säureesters mit einer N-Acyl-aminosäure (2c), der zweckmäßig bei 50–60° in Pyridin erfolgt. Tabelle II zeigt an Hand von zahlreichen Beispielen, daß die gewünschte Umsetzung mit einer durchschnittlichen Ausbeute über 80% verläuft und bei Verwendung aktiver Ausgangsmaterialien die optische Aktivität erhalten bleibt. Trotz der ausgezeichneten Ausbeuten besitzt diese Methode bei der Übertragung auf die Synthese höherer Peptide Nachteile. Man kann nämlich diese nur so erhalten, daß man N-Acylpeptide mit N-Carbonylamino-säureestern umsetzt. N-Carbonylpeptidester lassen sich nicht darstellen, da bei Einwirkung von Phosgen auf Peptidester, z. B. auf Glycylglycinester, nach (3) intramolekularer Ringschluß zu Hydantinderivaten erfolgt (z. B. Hydantoinessigsäure, R = R' = H). Man ist also

Aktivierung der Aminogruppe

gezwungen, höhere Peptide entsprechend der Gliederzahl durch wiederholte Umsetzung der N-Acylpeptidester mit N-Carbonylamino-säureestern zu gewinnen.



### Synthesen über Amide der Phosphorigen- und Phosphorsäure

#### Phosphorazoverbindungen

Nach Michaelis<sup>5</sup> reagiert Phosphortrichlorid mit primären Aminen nach (4), resp. nach (5) unter Bildung von Verbindungen der Zusammensetzung<sup>6,7</sup> RN:P.NH.R, die den Namen „Phosphorazo“-Verbindungen erhalten haben und in kristallisiertem Zustand nur bei Einsatz aromatischer Amine zu gewinnen sind. Sie sind bimolekular und besitzen auf Grund unserer Untersuchungen<sup>6</sup> die Struktur I; ihre Bildungsweise ist durch (6) gegeben.

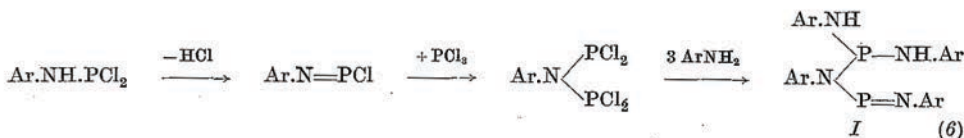


Tabelle III

Dipeptide nach der Phosphorazo-Methode<sup>8</sup>

Cbz-Dipeptid-äthylester	Ausb., %
-Gly-Gly-	91
-Gly-DL-Val-	95
-Gly-DL-Leu-	95
-Gly-L-Leu- <sup>a</sup>	89
-DL-Ala-Gly-	98
-DL-Val-DL-Val-	75
-DL-Ala-DL-Ala-	84
-Gly-DL-ε-Cbz-Lys-	78

<sup>a</sup> [α]<sub>D</sub> -30,3° (freies Peptid).

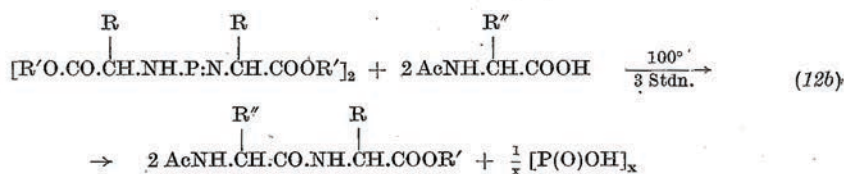
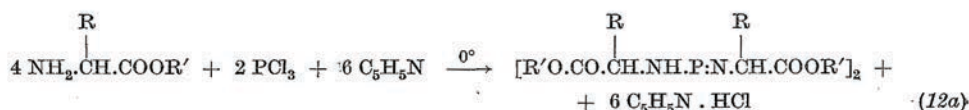
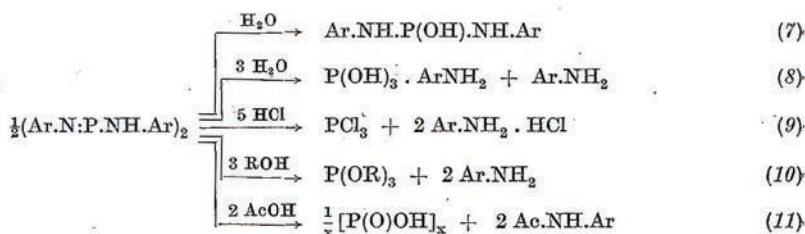
Tabelle IV

Tri- und Tetrapeptide nach der Phosphorazo-Methode<sup>8-10</sup>

Cbz-Peptid-äthylester <sup>a</sup>	Ausb., %
-Gly-Gly Gly-	88
-Gly Gly-Gly-	95
-α-Glu α-Glu-Glu- <sup>b</sup>	88
-α-Glu Gly-Gly- <sup>c</sup>	76
-γ-Glu Cy(SBz)-Gly- <sup>c,d</sup>	90
-α-Glu Cy(SBz)-Gly- <sup>c</sup>	79
-Cy(SBz)-Cy(SBz) Cy(SBz)- <sup>e</sup>	95
-Gly-Gly Gly-Gly-	97
-γ-Glu γ-Glu-γ-Glu-Glu- <sup>f</sup>	95
-Gly α-Glu-Gly-Gly- <sup>c</sup>	65

<sup>a</sup> Glutaminsäure und Cystein durchwegs in der L-Konfiguration. <sup>b</sup> Tetraäthylester. <sup>c</sup> Diäthylester. <sup>d</sup> [α]<sub>D</sub> -18,5° (freies Peptid in Wasser). <sup>e</sup> Methylester. <sup>f</sup> Pentaäthylester.

Die Phosphorazoverbindungen zeichnen sich durch große Reaktionsfähigkeit aus. So sind sie feuchtigkeitsempfindlich, gehen dabei zunächst nach (7) in N-Derivate der diaminophosphorigen Säure und dann (8) in das Mono-amin-salz der phosphorigen Säure über. Durch Chlorwasserstoff-Gas lassen sie sich wieder in Phosphortrichlorid und das Ausgangsamin zerlegen (9). Durch Einwirkung von Alkoholen (10) entstehen unter Abspaltung der Aminreste Triester der phosphorigen Säure. Von Wichtigkeit für den vorliegenden Zweck ist ihre Reaktion mit Carbonsäuren (11), die, wie Grimmel und Mitarbeiter<sup>7</sup> gefunden haben, zu Säureamiden führt. Es lag daher nahe, Phosphorazoverbindungen von Aminosäuren herzustellen und zu Peptidsynthesen zu verwenden. Die Darstellung der Phosphorazoverbindungen gestaltet sich außerordentlich einfach. Man tropft bei 0° 1 Mol Phosphortrichlorid in die Pyridinlösung des Aminosäureesters bzw. seines Hydrochlorids oder in die Toluollösung desselben, die zur Bindung der abgespaltenen Salzsäure die entsprechende Menge eines tertiärenamins, z. B. Triäthylamin, enthält (12a). Eine Isolierung der — nicht kristallisierenden — Phosphorazoverbindungen erübrigt sich. Man kann ihre Lösung — evtl. nach Entfernen des ausgeschiedenen Hydrochlorids R<sub>3</sub>N · HCl — direkt zur weiteren Umsetzung mit einer N-Acylaminosäure verwenden (12b).

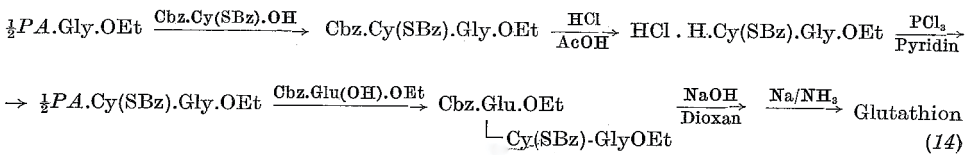
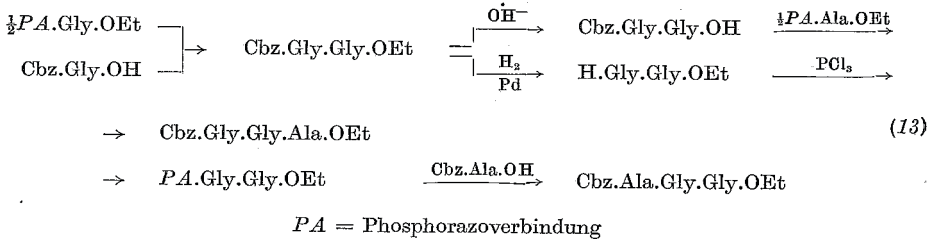


Voraussetzung für das Gelingen der Reaktionsfolge ist nur der unbedingte Ausschluß von Feuchtigkeit und die Verwendung reiner Ausgangsmaterialien, wie insbesondere von Phosphortrichlorid. Beobachtet man diese Erfordernisse, so liegen die Ausbeuten bei etwa 80% oder höher, wie Tabelle III zeigt<sup>8</sup>.

Die Methode läßt sich im Gegensatz zur N-Carbonylaminosäureester-Methode auch bei Verwendung von Peptidestern mit Erfolg durchführen (Schema 13). Dies zeigt die Darstellung einer Reihe von Tri- und Tetrapeptiden, deren Synthese ebenfalls mit recht guten Ausbeuten möglich ist<sup>9</sup> (Tab. IV). Auch bei einer neuen Synthese des Glutathions<sup>10</sup> hat sich die Verwendung

*Aktivierung der Aminogruppe*

der Phosphorazo-Methode bewährt. Sie erfolgte über die in Schema (14) angeführten Stufen. Aus dem N-Carbobenzoxy-S-benzylglutathion-ester lassen sich die Schutzgruppen in bekannter Weise entfernen.



Die Brauchbarkeit der vorstehendem Synthese ist u. a. durch eine vor kurzem erfolgte Veröffentlichung von Grassmann und Wünsch<sup>11</sup> anhand der Synthese einer größeren Zahl von Dipeptiden bestätigt worden (Tab. V). Sie konnten zudem ebenso wie wir zeigen, daß bei Einsatz optisch aktiver Komponenten die optische Aktivität in den gebildeten Dipeptiden erhalten bleibt.

Tabelle V  
Optisch-aktive Peptide nach der Phosphorazo-Methode<sup>11</sup>

Cbz-Peptid-äthyl- ester	Ausb., %	[α] <sub>D</sub> <sup>t</sup> /°C (freies Peptid, c = 2 in Wasser)
-L-Ala-Gly-	87	+ 51,44°/17
-L-Val-Gly-	88	+ 108,00°/18
-L-Leu-Gly-	88	+ 90,10°/17
-L-Pro-Gly-	93-94	+ 22,50°/19
-L-Lys-Gly-	81	+ 69,50°/22°
-Gly-L-Phe-	90	+ 42,20°/17
-Gly-L-Lys. <sup>a</sup>	89	- 13,00°/20 <sup>d</sup>
-Gly-L-Asp. <sup>b</sup>	95	+ 12,60°/23

<sup>a</sup> Methylester. <sup>b</sup> Dimethylester. <sup>c</sup> Monohydrochlorid. <sup>d</sup> Monohydrochlorid in 1N-HCl.

Im Zusammenhang mit den vorstehenden Ausführungen muß noch erwähnt werden, daß Süss<sup>12</sup> etwa gleichzeitig mit uns eine neue Peptidsynthese durchführen konnte, indem er auf ein Gemisch aus einem Acylpeptid und Aminosäureester Phosphortrichlorid einwirken ließ. Ob der Reaktionsverlauf der gleiche ist wie oben, also zunächst Bildung der Phosphorazoverbindung ein-

tritt oder ob sich zunächst ein Acylaminosäurechlorid bzw. ein gemischtes Anhydrid aus phosphoriger Säure und Acylaminosäure bildet, ist nicht sicher gestellt.

### Andere Amide der phosphorigen Säure

Durch Anderson und Mitarbeiter<sup>13</sup> ist festgestellt worden, daß sich auch andere Phosphitamide zur Synthese von Peptiden verwenden lassen, die in analoger Weise wie die Phosphorazoverbindungen umgesetzt werden können. Zunächst wurde Diäthylphosphitchlorid,  $(C_2H_5O)_2P\text{Cl}$ , vorgeschlagen, das sich aus Phosphortrichlorid und Äthylalkohol unter der Einwirkung von Dimethylanilin in Äther herstellen läßt, aber eine nicht sehr stabile Verbindung darstellt (auch die Ausbeuten belaufen sich nur auf etwa 50% d. Th.).

Setzt man das Diäthylphosphitchlorid mit einem Aminosäureester in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, wie Triäthylamin um, so entstehen analog den Phosphorazoverbindungen nach (15a) N-Phosphitaminosäure-(bzw. peptid)-ester, die sich zuweilen destillieren lassen und mit Acylaminosäuren unter Bildung von Acyl-peptidestern und Diäthylphosphit reagieren (16). Wie die Tabelle VI zeigt, sind die Ausbeuten dieser Umsetzung schwankend und übersteigen im Allgemeinen 50% nur wenig. Hinzu kommt, daß auch die Ausbeuten bei der ersten Reaktionsstufe (15a) bereits in der gleichen Größenordnung liegen. Besser als das Diäthylphosphitchlorid hat sich das *o*-Phenylenphosphitchlorid bewährt, das in 90% Ausbeute zugänglich ist, aber bei der zweiten Stufe auch kaum bessere Ergebnisse zeigte.



Eine Variante in der Verwendung von Dialkylphosphitchloriden zur Peptidsynthese besteht darin, daß man diese zunächst mit N-Acylaminosäuren zu gemischten Anhydriden umsetzt, bei denen eine Aktivierung der Carboxylgruppe eintritt<sup>14</sup>, also ein Reaktionsverlauf, über den Herr Wieland bereits berichtet hat.

Nicht nur ein Dialkylphosphitchlorid, sondern auch ein Tetraalkylpyrophosphit, z. B. Tetraäthylpyrophosphit, läßt sich nach Anderson und Mitarbeitern<sup>15</sup> zur Peptidsynthese unter Aktivierung der Aminogruppe mit Vorteil verwenden (Tab. VII). Man setzt zu diesem Zweck zuerst durch kurzes Erwärmen den Aminosäureester mit dem Pyrophosphit zu Diäthylphosphit und dem N-Diäthylphosphit-aminosäureester um (15b), der dann wie oben nach (16) mit der Acylaminosäure — unter Abspaltung von Diäthylphosphit — weiter reagiert. Als Lösungsmittel für die Umsetzungen hat sich Diäthylphosphit,  $(C_2H_5O)_2\text{POH}$ , sehr brauchbar erwiesen. Geht man von den Esterhydrochloriden aus, so erweist sich ein Zusatz der äquivalenten Menge Triäthylamin zur Bindung der Salzsäure notwendig, verwendet man den freien Ester, so unterbleibt dieser Zusatz. Tetraäthylpyrophosphit läßt sich bei Einsatz einer N-Acylaminosäure auch zur Aktivierung der Carboxylgruppe (Bildung des gemischten Anhydrids) gebrauchen, oder man kann im sogenannten Standard-Verfahren<sup>15</sup> die Mischung aus einer N-Acylaminosäure und einem Amino-

Tabelle VI

Peptidsynthesen mit Phosphit-amiden<sup>13</sup>

Acyl-Peptid- äthylester	Reagenz <sup>a</sup>	Ausb., % (roh)
Cbz-Gly-DL-Phe-	A	65
	A <sup>b</sup>	90
Phth-Gly-DL-Phe-	A	63
Cbz-L-Leu-L-Leu-	A	74
	B	77
Phth-Gly-DL-Ala-	A	43
Cbz-Gly-L-Tyr-	A	51
	B	40
Cbz-Gly Gly-Gly-	A	76

<sup>a</sup> A Diäthylphosphitamid, B *o*-Phenylphosphitamid. <sup>b</sup> 50% Überschuß an Phosphitamid.

Tabelle VII

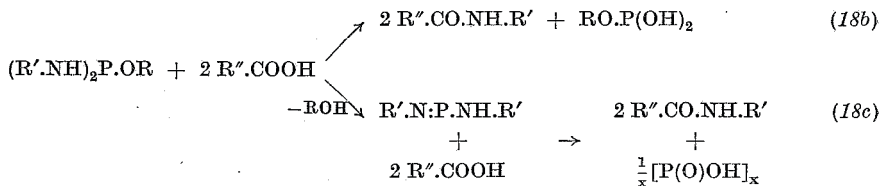
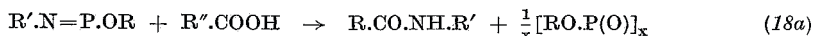
Peptidsynthesen mit Tetraäthylpyrophosphit<sup>15</sup>

Cbz-Peptid- äthylester	Ausb., %	$[\alpha]_D^{23-25}$ (EtOH)
-Gly-DL-Phe-	94	
-Gly-L-Leu- <sup>a</sup>	78—80	-26,5°
-Gly-L-Tyr-	65	+19,2°
-L-Leu-Gly-	56—58	-27,2°
-L-Leu-L-Tyr-	40	-14°
-DL-Val-DL-Ala-	60	
-L-Arg-L-Leu- <sup>b</sup>	52	-20,3° <sup>c</sup>
-Gly Gly-Gly-	78	
-L-Tyr Gly-Gly-	47	+6,5° <sup>d</sup>
-Gly-DL-Phe Gly-Gly-	25	
-Gly-L-Leu Gly-	61	-34,9°

<sup>a</sup> Phthaloyl. <sup>b</sup> Methyl ester-hydrobromid-mono-hydrat [Anderson G. W.: J. Am. Chem. Soc. 75, 608 (1953)]. <sup>c</sup> In Methanol. <sup>d</sup> In Eisessig.

säureester direkt mit Tetraäthylpyrophosphit umsetzen, wobei die Reaktion ebenfalls über das gemischte Anhydrid verläuft.

Es war nicht anzunehmen, daß die Verwendung von Derivaten der phosphorigen Säure zur Peptidsynthese auf die bis jetzt erwähnten Beispiele zu beschränken war. Wir haben daher untersucht, inwieweit sich andere substituierte Amide der phosphorigen Säure zur Säureamid- bzw. Peptidsynthese eignen. Als solche kamen N-substituierte Imino- und Diaminophosphorigsäuremonoester in Frage<sup>16</sup>. Man erhält sie, wenn man Dichlorphosphorigsäureester mit primären Aminen oder Aminosäureestern umsetzt (17a resp. 17b). N-substi-



tuerte Iminophosphorigsäureester entstehen, wenn man das Phosphorigsäureester-dichlorid mit 3 Mol Amin (Aminosäureester) reagieren läßt nach (17a). Sie reagieren mit Carbonsäuren (N-Acylaminosäuren) nach (18a). Diaminophosphorigsäureester treten — zumindest als Zwischenprodukte — bei der Reaktion eines Phosphorigsäureester-dichlorids mit 4 Mol Amin auf

(17b). Sie zerfallen allerdings offenbar unter Abspaltung von ROH zu Phosphorazoverbindungen (18c), die in der früher besprochenen Weise mit Carbonsäuren (N-Acylaminosäuren) weiter reagieren. Dies ergibt sich u. a. daraus, daß niemals der Phosphorigsäuremonoester [nach (18b)], sondern nur polymere metaphosphorige Säure bei dieser Reaktion isoliert werden konnte und daß sich die Abspaltung von ROH leicht nachweisen ließ. Gleichgültig, ob die Reaktionsfolge (17a, 18a) oder (17b, 18c) benützt wurde, konnte die Peptidsynthese anhand einiger Beispiele mit Ausbeuten von 80 bis 90% verwirklicht werden.

Tabelle VIII

Peptidsynthesen mit Äthylenphosphitchlorid bzw. Äthylphosphitdichlorid<sup>17</sup>

Cbzo-Peptid-äthylester	Reagenz <sup>a</sup>	Ausbeute, %		[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> (Lösungsmittel)
		roh	rein	
-Gly-DL-Phe Gly-	C	78	55	-11,9° (EtOH)
-Gly L-Phe-Gly-	C	71	64	
	D	74	70	
-Gly-L-Phe Gly-	C	89	72 <sup>e</sup>	-34,9° (EtOH)
-Gly Gly-DL-Phe-	C	96	78	
-L-Tyr Gly-Gly-	D	71	44	
-Gly-L-Leu Gly-	D	74	39	-28,6° (EtOAc)
-Gly-L-Leu Gly- <sup>b</sup>	D	88	54	-26,7° (EtOH)
-L-Leu-Gly-	D	85	74	-21,6° (MeOH)
-L-Arg-L-Leu- <sup>c</sup>	D	64	40	-15,9° (EtOH)
-L-Phe-Gly-	C	76	62	-8,4° (AcOH)
-L-Phe-Gly- <sup>d</sup>	C	72	45	

<sup>a</sup> C Äthylphosphitdichlorid, D Äthylenphosphitchlorid. <sup>b</sup> Methyl ester. <sup>c</sup> Methyl ester-hydrochlorid-monohydrat. <sup>d</sup> Benzylester. <sup>e</sup> Unter optimalen Bedingungen; daneben 2% Razemat

In einer größeren Arbeit haben sich dann noch Anderson und Mitarbeiter<sup>17</sup> mit der Verwendung von Phosphorigsäureesterchloriden bei der Peptidsynthese beschäftigt. Neben dem bereits durch uns untersuchten Dichlorophosphorigsäureäthylester, der durch Reaktion von Phosphortrichlorid mit Äthylalkohol ohne Zusatz eines säurebindenden Mittels entsteht, fand das Äthylenphosphitchlorid (CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>PCl Verwendung, das nach Lucas und Mitarbeitern<sup>18</sup> aus Glycol und Phosphortrichlorid unter Zusatz von wasserfreiem Calciumchlorid erhalten wird. Im Übrigen erfolgten die Umsetzungen unter Aktivierung der Aminogruppe, wie bereits besprochen, mit Diäthylphosphit als Lösungsmittel. Die wesentlichen Ergebnisse der genannten Arbeit enthält Tabelle VIII. Auf eine Variante der Methode sei noch hingewiesen, die in speziellen Fällen von Vorteil sein mag. Führt man nämlich die erste Reaktionsfolge in einem Trialkylphosphit, z. B. Triäthylphosphit als Lösungsmittel durch, so erübrigt sich der Zusatz von Triäthylamin als salzsäurebindendes Mittel. Dies beruht darauf, daß Chlorwasserstoff und Trialkylphosphite sich nach (19) zu Dialkylphosphit und Alkylchlorid umsetzen.



## Razemisierung

Soweit sich bisher ergeben hat, verlaufen Peptidsynthesen unter Aktivierung der Aminogruppe bei Einsatz optisch aktiver Aminosäuren ohne Razemisierung, wenn man die Synthesen zur Bildung von Dipeptiden verwendet. Dies zeigen die Arbeiten von Grassmann<sup>11</sup>, Anderson<sup>13,15,16</sup> und insbesondere unsere eigenen Versuche<sup>8-10</sup> und unveröffentlichten Ergebnisse. Dagegen ist von Grassmann, Wunsch und Riedel<sup>18</sup> neuerdings am Beispiel des Glycyl-L-phenylalanyl-L-alanins beschrieben worden, daß bei der Synthese höherer Peptide eine teilweise Razemisierung auftreten kann. Für die Synthese eines höheren Peptids bestehen zwei Möglichkeiten: *A.* Reaktion einer N-Acylaminosäure mit der Phosphorazoverbindung eines Peptidesters, *B.* Reaktion eines N-Acylpeptids mit der Phosphorazoverbindung eines Aminosäureesters. Grassmann, Wunsch und Riedel nehmen auf Grund ihrer Erfahrung bei der Synthese von Glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin, die nach *B* aus der Phosphorazoverbindung des L-Alaninesters und Carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanin erfolgte, an, daß sich abgesehen von besonderen Fällen nur nach *A* eine Razemisierung vermeiden läßt. Unsere eigenen Ergebnisse bei der Synthese von aktiven Tripeptiden (Tab. IX) sprechen nicht für die allgemeine Gültigkeit der Ansicht von Grassmann, Wunsch und Riedel. Aus den Beispielen Lysyl-lysyl-lysin und Glycyl-L-lysyl-glycin, die unter Verwendung von Acyldipeptiden aufgebaut wurden, ist zu entnehmen, daß auch beim Verfahren *B* eine Razemisierung nicht unbedingt aufzutreten braucht.

Tabelle IX

Optische Aktivität einiger nach dem Phosphorazo-Verfahren synthetisierter Peptide  
(S. Goldschmidt und G. Roseculet, unveröffentlicht.)

Cbz-Peptid-ester <sup>a</sup>	Ausb., %	Freies Peptid	
		$[\alpha]_D^{20-21}$ <sup>b</sup>	Salz in 0,5N-HCl
-Gly-L-LysOMe	76	-12,6°	HCl
-L-Ala-L-LysOMe	73,5	-7,4°	HCl
-D-Ala-L-LysOMe	71	-30,4°	HCl
-L-Lys-Gly OEt	82	+40,6°	HCl
-L-Lys-Gly OBz	87	+31,3°	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>d</sup>
-L-Lys-L-AlaOEt	87,5	+2,7°	HCl
-L-Lys-D-AlaOEt	81	+80,4°	HCl <sup>c</sup>
-L-Lys-L-LysOMe	79	+8,2°	3 HCl
-L-Lys-L-TyrOMe	76	+17,1°	AcOH <sup>d</sup>
-L-Tyr-L-LysOBz	71		AcOH
-L-Lys-L-Asp(OEt)OEt	75	+23,1°	- <sup>d</sup>
-L-Lys-L-ValOEt	78		
-L-Val-L-OrnOMe	81	+18,4°	HCl <sup>c</sup>
-L-Orn-L-LeuOMe	81	+2,1°	HCl <sup>d</sup>
-Gly[L-Lys-GlyOBz	73	-31,7°	HCl
-L-Lys-L-Lys[L-LysOMe	70,5	-2,2°	3 HCl
-L-Lys[Gly-GlyOEt	83,5	+24,2° <sup>ee</sup>	HCl
-Gly-Gly[L-LysOMe	73	-8,1° <sup>ee</sup>	HCl
-L-Orn[Gly-GlyOEt	76,5	-15,9° <sup>ee</sup>	HCl
-Gly-Gly[L-OrnOMe	75	-5,7° <sup>ee</sup>	HCl

<sup>a</sup> Die  $\omega$ -Aminogruppen des Lysins bzw. Ornithins sind durch Carbobenzoxygruppen geschützt. <sup>b</sup> Die gefundenen Werte stimmen durchwegs gut mit den in der Literatur verzeichneten überein. <sup>c</sup> In 1N-HCl. <sup>d</sup> In Wasser. <sup>e</sup> Nicht in der Literatur verzeichnet.

## Phosphorsäurederivate

Die vorgetragenen Reaktionen von Derivaten des dreibindigen Phosphors lassen sich auch mit Derivaten des fünfbindigen Phosphors durchführen. Auch

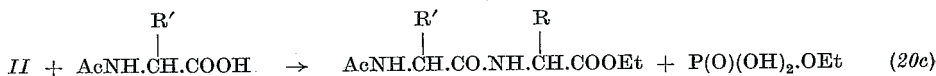
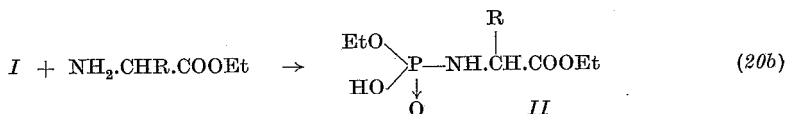
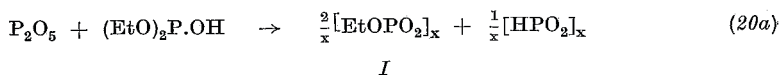
diese können zur Herstellung von Säureamiden Verwendung finden, jedoch reagieren sie allgemein viel träger als Derivate des dreibindigen Phosphors. Für Peptidsynthesen besitzen sie deshalb kaum Interesse. Vor kurzem haben jedoch Schramm und Wissmann<sup>20</sup> eine neue Peptidsynthese beschrieben, die offenbar auf einer Aktivierung der Aminogruppe beruht. Sie kommt dadurch zustande, daß man zunächst in einem alkoxyhaltigen Lösungsmittel (Diäthylphosphit) einen Aminosäure- bzw. Peptidester mit Phosphorpenoxyd in Gegenwart tertiärer Basen umsetzt und das Reaktionsprodukt dann mit einer N-Acylaminosäure bzw. einem N-Acylpeptid bei 100° zur Reaktion bringt. Die bisherigen Ergebnisse dieser neuen Methode sind in Tabelle X zusammen-

Tabelle X  
Peptidsynthesen mit Phosphorpenoxyd-Diäthylphosphit<sup>19</sup>

Cbz-Peptid-äthylester	Ausb. %
-Gly-Gly-	83
-DL-Ala-Gly-	81
-Gly-Gly Gly-	77
-DL-Ala-Gly Gly-	79
-Gly-L-Leu <sup>a</sup>	56
-Gly-L-Leu Gly <sup>b</sup>	63
-L-Phe-Gly <sup>c</sup>	60
-DL-Leu Gly-Gly-	50
-DL-Ala-Gly-Gly DL-Ala-Gly-Gly-	30

<sup>a</sup>  $[\alpha]_D -8,4^\circ$  (EtOH). <sup>b</sup>  $[\alpha]_D -31,8^\circ$  (EtOH). <sup>c</sup>  $[\alpha]_D -17,0^\circ$  (EtOH).

gefaßt. Man ersieht anhand der wenigen Beispiele, daß auch bei Durchführung der neuen Reaktion mit optisch-aktiven Ausgangsmaterialien eine Razemisierung nicht eintritt.



Die zunächst etwas merkwürdig anmutende Reaktion beruht primär auf der Reaktion des Phosphorpenoxyds mit Diäthylphosphit. Aus den Untersuchungen von Langheld<sup>21</sup> sowie von Steinkopf und Mitarbeitern<sup>22</sup> ist bekannt, daß Phosphorpenoxyd äthoxyhaltige Verbindungen unter Bildung von wohl polymerem Metaphosphorsäuremonoäthylester  $(C_2H_5OPO_2)_x$  zu spalten vermag. Bringt man Phosphorpenoxyd und Diäthylphosphit zusammen, so kommt es zunächst zur Bildung des Metaphosphorsäureäthylesters nach (20a). Dieser reagiert dann nach (20b) unter Anlagerung des Aminosäureesters zu einem Orthophosphorsäureamidester. Der letztere

setzt sich mit der N-Acylaminosäure unter Abspaltung von Orthophosphorsäure-monoäthylester zum N-Acyl-dipeptidester um (20c).

Literatur

1. Siefken S.: *Ann.* 562, 97 (1949).
2. Goldschmidt S.: *Z. Naturforsch.* 5b, 170 (1950).
3. Goldschmidt S., Wick M.: *Ann.* 575, 217 (1952).
4. Wurtz C. A.: *Ann. chim.* [3] 42, 53 (1854).
5. Michaelis A., Schroeter G.: *Ber.* 27, 490 (1894); *Ann.* 326, 129 (1903).
6. Goldschmidt S., Krauß H. L.: *Ann.* 595, 193 (1955).
7. Grimm H. W., Guenther A., Morgan J. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 593 (1946).
8. Goldschmidt S., Lautenschlager H.: *Ann.* 580, 68 (1953).
9. Goldschmidt S., Jutz C.: *Chem. Ber.* 89, 518 (1946).
10. Goldschmidt S., Jutz C.: *Chem. Ber.* 86, 1116 (1953).
11. Grassmann W., Wunsch E.: *Chem. Ber.* 91, 450 (1958).
12. Süs O.: *Ann.* 572, 96 (1951).
13. Anderson G. W., Blodinger J., Young R. W., Welcher D.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5304 (1952).
14. Anderson G. W., Young R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5307 (1952).
15. Anderson G. W., Blodinger J., Welcher A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5309 (1952).
16. Goldschmidt S., Obermeier F.: *Ann.* 588, 24 (1954).
17. Young R., Kloud K., Joyce J., Anderson G.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2126 (1956).
18. Lucas H. J., Mitchell F. W., Seully C. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 72, 5491 (1950).
19. Grassmann W., Wunsch E., Riedel A.: *Chem. Ber.* 91, 455 (1958).
20. Schramm G., Wissmann H.: *Chem. Ber.* 91, 1073 (1958).
21. Langheld K.: *Ber.* 44, 2076 (1911).
22. Steinkopf W., Schubart I.: *Ann.* 424, 1 (1921).

Diskussion

zu den Referaten von TH. WIELAND und ST. GOLDSCHMIDT

WIELAND: Wodurch ist es denn ausgeschlossen, daß bei der Schramm-Wissmanschen Methode das Diäthylphosphit Tetraäthylpyrophosphit bildet, das dann nach der Pyrophosphitmethode reagiert?

GOLDSCHMIDT: Schramm und Wissman haben die Verbindungen analysiert — nicht bei Aminosäuren, aber bei Anilin, glaube ich.

WIELAND: Sie wissen wohl am besten, daß man von Anilin nicht ohne weiteres auf die Aminosäureester schließen kann!

GOLDSCHMIDT: Gewiß, aber im Prinzip verlaufen die Umsatzreaktionen doch gleich — nicht die weiteren Reaktionen aber.

WIELAND: Zum Beispiel haben Sie doch auch Ihre Studien über den fünfbindigen Phosphor mit Anilin als Modellsubstanz gemacht.

GOLDSCHMIDT: Mit dem fünfbindigen Phosphor sind wir deshalb nur bei Anilin geblieben, weil die notwendigen Verbindungen, die dem dreiwertigen Phosphor entsprechen und von denen wir glauben, daß sie reagieren sollten, nicht zu erhalten sind; wir sind da an präparativen Schwierigkeiten gescheitert.

WIELAND: Hat sich da nicht gezeigt, daß die Anilino-Verbindungen reaktionsfähiger sind als die echten Aminosäureesterverbindungen? Jedenfalls sind die Anilino-Verbindungen des fünfwertigen Phosphors viel weniger reaktionsfähig als die des dreiwertigen. — Aber Sie halten es auch für möglich, daß die Bildung von Pyrophosphit eine Erklärung wäre?

GOLDSCHMIDT: Das könnte man sich vorstellen. Es entsteht wohl zunächst der Monoäthylester der metaphosphorigen Säure. Diesen kann man auf zwei verschiedenen Wegen erhalten, und die Autoren haben nachgewiesen, daß er in beiden Fällen — kristallisiert ist er ja nicht — die gleichen Eigenschaften hat.

ROTHE: Ich glaube auch nicht, daß sich Tetraäthylpyrophosphit bei der Reaktion bildet. Wir haben nämlich versucht, cyclische Peptide mit Tetraäthylpyrophosphit in Diäthylphosphit als Lösungsmittel herzustellen. Weil man da bei Anwendung des Verdünnungsprinzips große Mengen Lösungsmittel braucht, haben wir versucht, Diäthylphosphit von früheren Ansätzen mit Phosphorperoxyd zu trocknen. Dann haben wir abdestilliert. Wenn sich nun Tetraäthylpyrophosphit dabei gebildet hätte, würde es mit überdestillieren und man müßte nun mit dem Destillat dieselben Cyclisierungs-Ergebnisse bekommen. Daher glaube ich, daß sich bei der Einwirkung von Phosphorperoxyd auf Diäthylphosphit kein Tetraäthylpyrophosphit bildet. Es passieren aber noch allerhand unkontrollierbare Dinge, denn es entsteht bei der Destillation auch Phosphorwasserstoff.

RUDINGER: Im Zusammenhang mit dem Pyrophosphit möchte ich auf eine Arbeit von Maclaren in Australien aufmerksam machen [*Proc. Internat. Wool Textile Research Conf., Australia, 1955*]; der sagt, daß das Tetraäthylpyrophosphit keine definierte Verbindung ist, sondern eine Mischung von langkettigeren und kurzkettigeren Polyphosphiten. Wenn man refraktioniert, dann bekommt man immer wieder das gleiche Kochpunktintervall. Er bestimmt die Aktivität des Präparats analytisch und nimmt nicht an, daß es stöchiometrisch ist.

GOLDSCHMIDT: Andersen beschreibt auch, daß es nicht rein ist. Er gibt den Prozentgehalt an.

RUDINGER: Nach der Refraktion nimmt er an, daß da soundsoviel Prozent Pyrophosphit und der Rest Diäthylphosphit ist. Ich glaube nicht, daß das ganz berechtigt ist.

TASCHNER: Ich möchte hier eine Methode der Peptidsynthese anführen, die wir unlängst bearbeitet haben [Sokolowska T., Kupryszewski G., Taschner E.: *Bull. acad. Polon. sci. class. III, 6, 89 (1958)*; *Roczniki Chem.*, im Druck].

Die Reaktion wird so durchgeführt, daß man die N-acylierte Aminosäure und einen Aminosäureester oder dessen Hydrochlorid in trockenem Pyridin löst, Benzolsulfochlorid unter Kühlung zutropft, 1–24 Stunden bei Raumtemperatur beläßt und dann den Peptidester mit Wasser ausfällt. In den meisten Fällen waren die Reaktionsprodukte kristallin. Aus der Tabelle kann man ersehen, daß die Ausbeuten manchmal sehr zufriedenstellend waren. An zwei Beispielen

konnte festgestellt werden, daß die Reaktion ohne Racemisierung verläuft. Die Synthese geht mit N-tosylierten oder N-phthalylierten Aminosäuren, nicht dagegen mit carbobenzoxylierten.

Man kann vermuten, daß die Reaktion entweder über ein gemischtes Anhydrid R.CO.O.SO<sub>2</sub>Ar, oder über ein symmetrisches Anhydrid verläuft. Nach Prof. Wieland [Wieland T., Bernhard H.: Ann. 572, 190 (1951)] geht die Synthese von Peptiden mit Hilfe von Thionylchlorid über symmetrische Anhydride, da die Ausbeuten an Peptidestern 50% nicht überschreiten.

Tabelle  
Peptidsynthese mit Benzolsulfochlorid in Pyridin

Produkt	Ausb., %	Smp., °C
Phth-Gly-GlyOMe	79	202
Phth-Gly-DL-LeuOe	54	165–166
Phth-DL-Leu-GlyOEt	52	126
Phth-DL-Phe-GlyOMe	90	135–136
Phth-Gly-DL-Phe-OMe	86	125
Tos-L-Tyr(OTos)-DL-PheOMe	92	110–118
Tos-L-Tyr(OTos)-DL-NorvalOMe	84	102–105
Tos-L-Tyr(OTos)-GlyOMe	95	75–76
Phth-Gly-L-Glu(OMe)OMe	36	158–159

Nun scheint es, daß im unseren Falle die Reaktion ebenfalls über symmetrische Anhydride geht, obwohl die Ausbeuten 50% übersteigen. Brewster und Ciotti [J. Am. Chem. Soc. 77, 6214 (1955)] erhielten aus Benzoesäure und Benzolsulfochlorid in Pyridin das Benzoesäureanhydrid. Wir erhielten aus Phthalylglycin und Benzolsulfochlorid das Phthalylglycinanhydrid in etwa 75% Ausbeute. Nun versuchen wir auch Anhydride anderer Aminosäuren darzustellen. Prof. Wieland hat ja solche Verbindungen seinerzeit dargestellt [Wieland T., Kern W., Sehring R.: Ann. 569, 117 (1950)]; sie sind instabil. Die Produkte, die wir erhielten, waren nicht kristallin, gaben eine positive Anhydridreaktion und enthielten keine Sulfosäuregruppe.

Wenn wir nun den Weg über das symmetrische Anhydrid annehmen, so bleibt noch die Frage offen, wie die Ausbeuten die 50% Grenze überstiegen. Das symmetrische Anhydrid, das aus der Säure und den Sulfochlorid entsteht, reagiert mit dem Aminosäureester. Die regenerierte Säure reagiert aber dann weiter mit dem Sulfochlorid, so daß ein cyclischer Prozeß vor sich geht.

WIELAND: Welches Mol-Verhältnis zwischen Acylaminosäure und Benzolsulfochlorid benötigen Sie?

TASCHNER: Mol pro Mol.

WIELAND: Geht das stöchiometrisch auf?

TASCHNER: Ja. Wir haben auch einen Überschuß an Benzolsulfochlorid benutzt. Meine Mutmaßung, daß die Reaktion über das symmetrische Anhydrid geht, basiert auch auf Ihrer Erfahrung mit Thionylchlorid. Es beunruhigt mich jedoch, warum in Ihrem Falle die Reaktion nicht auch cyclisch verlief.

WIELAND: Wohl weil das Thionylchlorid viel empfindlicher ist, besonders in Pyridin.

BRENNER: Warum kann man nicht die Carbobenzoxyaminosäuren nehmen?

TASCHNER: Die Carbobenzoxypeptide fielen gewöhnlich ölig aus und die Ausbeuten überschritten nie 20%. Oft wurde auch der Geruch von Benzylalkohol wahrgenommen.

BRENNER: Das entspricht dem Benehmen der Carbobenzoxyaminosäurechloride, die zersetzen sich ja auch in Pyridin. Meine zweite Frage ist: Haben Sie nie Benzolsulfonamidossäureester erhalten?

TASCHNER: Daran haben wir gedacht, aber beobachtet haben wir es nicht. Bei hohen Ausbeuten werden die Aminosäureester eher nicht angegriffen, dort aber wo schwache Ausbeuten vorkamen, könnte solch eine Nebenreaktion der Grund dafür sein.

WIELAND: Ich wollte Herrn Prof. Goldschmidt etwas fragen. Es ist doch bekannt, daß man mit Phenylthiocarbonylderivaten der Aminosäuren auch Peptidsynthesen machen kann. Noguchi

hat auf diese Weise hochmolekulare Peptide erzeugt. Was ist das für eine Reaktion? Geht das im Endeffekt über die Isocyanato-Verbindungen?

GOLDSCHMIDT: Wahrscheinlich wohl. Es ist eine sehr unübersichtliche Reaktion. Zum Teil lassen sich Noguchis Angaben gar nicht reproduzieren; auf der anderen Seite kann man diese Reaktion durch den Zusatz von tertiären Aminen beschleunigen, aber man bekommt dabei Hydantoinderivate. Wahrscheinlich verlaufen diese Reaktionen über die Leuchs'schen Körper.

BRENNER: Herr Wieland, Sie haben bemerkt, daß Sie die Methode der gemischten Anhydride in ihrer Anwendungsbreite durch einen Zusatz von Trichloressigsäure verbessern konnten. Würden Sie, bitte, ein wenig genauer sagen, wie Sie das machen?

WIELAND: Das Problem der Löslichkeit der Peptidkomponenten in Tetrahydrofuran hat sich besonders bei synthetischen Versuchen auf dem Gebiete der Knollenblätterpilzgifte unangenehm bemerkbar gemacht, wo man eine Cyclisierung nach der Anhydridmethode versucht hat; dabei hat sich gezeigt, daß die zu cyclisierenden Peptide in den gebräuchlichen Lösungsmitteln nicht oder nur sehr schwer löslich sind. Da haben wir einfach in den Ansatz, bevor wir das Anhydrid gebildet haben, Trichloressigsäure zugegeben. Das hat funktioniert. Aber es war dann natürlich interessant, an einer Modellpeptidsynthese, die nicht zu einem Cyclus zu führen braucht, sondern einfach aus zwei Komponenten das Peptid aufbauen soll, die Brauchbarkeit dieser Lösungsvermittlung zu studieren. Man löst hierzu die acylierte Komponente, also entweder Carbobenzoxycarbonsäure oder Carbobenzoxypeptid, in Tetrahydrofuran plus etwas Trichloressigsäure auf, fügt die zu acylierende zweite Komponente zu dieser Mischung dazu, dann kühlt man tief ab, gibt die berechnete Menge tertiärer Base zu und gleich das Äthylkohlenensäurechlorid. Man läßt eine Zeitlang stehen, arbeitet auf und erhält Peptid.

BRENNER: Verwenden Sie die berechnete Menge an Äthylkohlenensäurechlorid?

WIELAND: Ja, und Trichloressigsäure. Und dabei beobachtet man, daß gar nichts aus dem Ansatz ausfällt. — Bei dem Modellversuch, den wir gemacht haben, war die Ausbeute wegen der schlechten Krystallisierbarkeit des Peptids nicht sehr hoch, aber ich glaube, wenn man die Reaktion etwas ausarbeiten würde, könnte man Trichloressigsäure als Löslichkeitsvermittler benutzen.

BRENNER: Ich möchte im Anschluß auch etwas über Trichloressigsäure sagen. Wir standen vor einigen Jahren vor dem Problem Methionyl-methionin abzutrennen. Es hat sich gezeigt, daß man sehr leicht das Dipeptid aus seiner wäßrigen Lösung in Essigester hineinextrahieren kann, wenn das System gleichzeitig etwa 2–5% Trichloressigsäure enthält. Unter denselben Bedingungen bleibt die Aminosäure einigermassen in der wäßrigen Phase. Das ist auch eine Lösungsvermittlung, die man sich nicht ohne weiteres erklären kann und die vom praktischen Standpunkt aus nützlich sein kann.

ROTHE: Ich wollte zu dem Vortrag von Herrn Prof. Wieland noch etwas sagen. Prof. Wieland hat eine Reihe von Darstellungsverfahren für Ester, und zwar auch Alkylester, Phenyl- und Thioester, angegeben, und ich wollte noch ein weiteres hinzufügen das wir vor einiger Zeit gefunden haben [Ann. 609, 88 (1957); *Tagungsber. der Hauptjahrstagung der Chem. Ges. (D. D. R.) 1956*]. Das ist eine Methode, die sich durch besondere Einfachheit und Ergiebigkeit auszeichnet. Sie war in der Peptidchemie damals noch nicht durchgeführt worden, wohl aber in einem Patent für gewöhnliche Ester von Schmidt aus München erwähnt worden. Es handelt sich darum, die Dicyclohexylcarbodiimid-Methode auf die Esterdarstellung auszudehnen. Wenn man eine Acylaminosäure oder ein entsprechendes Peptid mit dem Phenol oder Thiophenol in einem indifferenten Lösungsmittel auflöst und dann bei gewöhnlicher Temperatur Dicyclohexylcarbodiimid hinzufügt, kann man in sehr guten Ausbeuten den Ester bekommen. Wir haben den dabei entstandenen Dicyclohexylharnstoff immer quantitativ bestimmt und Ausbeuten über 90%, meist über 95% bekommen. Wir haben dann den Ester aus dem Filtrat isoliert und auch Ausbeuten von 80% oder 90% bekommen, je nach Isolierungsmöglichkeit, je nach Schmelzpunkt des betreffenden Esters. Man kann nach dieser Methode aber nicht nur Phenyl-, Nitrophenyl- und Thiophenylester herstellen, sondern auch Alkylester, also beispielsweise Äthylester, Benzylester oder Cyanmethylester, und zwar dann, wenn man mit tertiärem Amin katalysiert; sonst geht das nicht, sonst entsteht bei den Alkylestern nur etwa 50% an Harnstoff und es wird sich wahrscheinlich das entsprechende Anhydrid der Acylaminosäure bilden. Wenn man aber Pyridin zugibt, sind die Ausbeuten bei den Alkylestern ebenfalls so hoch. Wir haben dabei auch keine Racemisierung feststellen können und das stimmt überein mit einer Arbeit, die inzwischen von Elliott und Russell erschienen ist [Biochem. J. 66, 49p (1957)]; sie haben diese Methode allerdings nur auf die *p*-Nitrophenylester angewendet und erwähnen auch, man habe maximal 3% Racemisierung beobachtet. Dazu ist aber zu sagen, daß Elliott und Russell gleichzeitig die Peptidsynthese an die Estersynthese anschließen, also nicht den Ester isolieren, so daß in diesem zweiten Schritt auch noch die Gefahr der Racemisierung besteht. Es ist eine Methode, die meines

Erachtens, weil sie bei Zimmertemperatur oder noch tieferen Temperaturen stattfindet und sehr einfache Reagenzien beansprucht, mit der Schwyzerschen Diarylsulfit-Methode ohne weiteres konkurrieren kann.

RUSSELL: For some synthetic purposes, it is advantageous or even essential to couple with free amino-acids rather than their esters, and here the activated ester method has been very satisfactory.

M. Bodánszky and others [Bodánszky M., Szelke M., Tomorkény E., Weisz E.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 11, 179 (1957); Bodánszky M.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 10, 335 (1957); Farrington J. A., Hextall P. J., Kenner G. W., Turner J. M.: J. Chem. Soc. 1957, 1407] have shown that *p*-nitrophenyl esters will react with free amino-acids. Such experiments have usually been done in buffered medium near neutrality, presumably to avoid hydrolysis of the activated ester, and yields were only moderate. We find that a high pH is no disadvantage, and good yields are obtainable with one equivalent of aqueous alkali. Yields are also improved if the *p*-nitrophenyl esters are not isolated but used *in situ*, and a simple way to prepare them is by using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide [Elliott D. F., Russell D. W.: Biochem. J. 66, 49p (1957)].

In a typical experiment\*, a solution in dimethylformamide of benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanine, *p*-nitrophenol and carbodiimide was allowed to stand overnight, then treated with a solution of L-histidine in one equivalent of N-NaOH and two equivalents of sodium carbonate. The mixture was shaken for two hours. The working up in this case was simplified by the fact that the product, benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidine,\*\* is soluble in water at all pH's, but forms a water-insoluble copper derivative. A similar condensation procedure was used to prepare benzyloxycarbonyl-L- $\alpha$ -aspartyl-L-arginine  $\beta$ -benzyl ester, although in this case excess alkali had to be avoided because of the  $\beta$ -ester group. The yield in this case was 50%. With this peptide the mixed anhydride method was unsuccessful.

When we tried to couple benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valine with L-histidine, the same method gave only a 20% yield. Better results were obtained when the nitrophenyl ester was treated with L-histidine methyl ester. The acyl tetrapeptide ester was easily separated by its insolubility in chloroform, and after saponification the required product was obtained in 50% overall yield. In this case steric factors were probably of importance.

The product obtained by coupling with a free amino-acid will be a mixture of carboxylic acids, and unless a basic amino-acid is being used, special techniques of isolation may be necessary. In such cases we have preferred to use a conventional coupling with esters, using dicyclohexylcarbodiimide.

Crystallisation of benzyloxycarbonyl-amino-acids and -peptides is sometimes difficult, but their cyclohexylammonium salts often crystallize well. This is the case with O-acetyl-N-benzyloxycarbonyl-L-tyrosine, which as usually prepared [Bergmann M., Zervas L., Salzmann L., Schleich H.: Z. physiol. Chem. 224, 17 (1934)] is amorphous but forms a crystalline salt with cyclohexylamine. For carbodiimide coupling there is no need to regenerate the free acid. Instead, an equivalent of amino-acid ester hydrochloride is added, followed by carbodiimide. Little, if any, cyclohexylamide is formed, and using as solvent tetrahydrofuran containing 15% of water, we isolated 70% of O-acetyl-N-benzyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-valine methyl ester. The yield was over 80% when the reaction was carried out in anhydrous ethylene dichloride. Similar results were obtained with benzyloxycarbonyl-L-proline and L-phenylalanine methyl ester.

YOUNG: Prof. Goldschmidt, in your Table you showed the coupling of benzyloxycarbonyl-glycyl-L-lysine with glycine ester by the phosphorazo method. May I ask whether you can definitely exclude the presence of any racemic material in your mother liquors?

GOLDSCHMIDT: Ja, ich glaube, daß wir das ausschließen können. Die Schmelzpunkte waren ganz scharf.

YOUNG: I meant in the mother liquors, not in your product, but in the material which was not isolated.

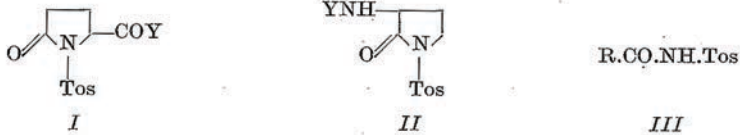
GOLDSCHMIDT: Das weiß ich im Augenblick nicht.

RUDINGER: Ich möchte einige Worte über die Methode sagen, die an die aktivierten Amide, wie sie Herr Professor Wieland klassifiziert hat, anschließt; wir nennen sie die Methode der aktivierten Lactame. Es ist wohl bekannt, daß es sich um Verbindungen des Typs I oder II handelt. Diese Tosyllactame, also Imide, werden ganz leicht aminolytisch geöffnet. Wir hatten gedacht, daß dies vielleicht eine allgemeine Peptidsynthese ergeben könnte; denn es ist ja z. B. das Tosyl-tocyanat bekannt und wir hatten gedacht, man könnte daran eine Carbonsäure anlagern, das

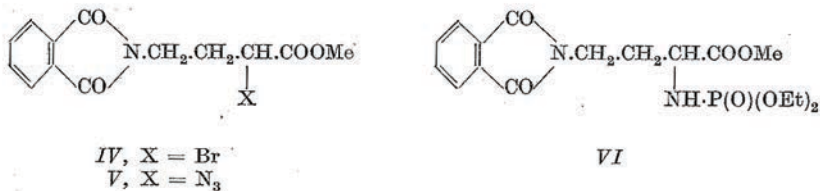
\* Elliott D. F., Russell D. W.: unpublished work.

\*\* Added in proof: The phenylalanine is now known to have been extensively racemised.

Imid *III* erhalten — diese Reaktion ist auch bekannt — und dann dieses Imid reagieren lassen. Wir haben Modellversuche mit N-Tosylbenzamid gemacht und das reagiert nur unter etwas drastischen Bedingungen. Wir halten es für wahrscheinlich, daß dies darum ist weil ja das Imid eine ziemlich starke Säure ist (es ist löslich in Bicarbonat), daß also unter den Bedingungen der Reaktion in Gegenwart von Base Ionisierung der NH-Gruppe stattfindet und daß natürlich das Ion dann einem Angriff an dem Carbonyl gegenüber stark desaktiviert ist. Man könnte das bestätigen, wenn man das N-Methylderivat herstellte; das haben wir aber schon nicht mehr gemacht, weil dadurch natürlich der Reiz der Methode stark herabgesetzt wird. Es wird also diese Tosylimid-Methode wohl eben auf Tosyllactame beschränkt bleiben.



Weiter möchte ich noch über einen kleinen Versuch von Herrn Kollegen Zaoral berichten. Bei einer Gelegenheit hat er das Derivat *IV* hergestellt, und zwar war das in einer Synthese der Diaminobuttersäure selbst. Da wurde gefunden, daß das Halogen in  $\alpha$ -Stellung sehr schwer direkt durch eine Aminogruppe zu ersetzen ist, daß jedoch die Reaktion über die Azido-Verbindung sehr glatt geht. Die Azido-Verbindung *V* wurde dann mit Jodwasserstoffsäure zersetzt, so wie übrigens in letzter Zeit Prof. Wieland die Behandlung mit Bromwasserstoffsäure statt katalytischer Reduktion gebraucht hat.



Nun ist in der Literatur eine Methode zur Darstellung von Amiden durch Reaktion von Carbonsäuren mit Azido-Verbindungen und Verbindungen des dreiwertigen Phosphors erwähnt [Horner L., Gross A.: Ann. 591, 117 (1955)]. Wie hier schon betont worden ist, sind ja im Prinzip alle Methoden der Amidbildung potenzielle Methoden der Peptidsynthese, also hat Herr Zaoral auch versucht, ob sich das nicht verwerten ließe. Er hat wirklich aus Carbobenzoxycylin und Azidoessigsäureester in Gegenwart von Triäthylphosphit das Peptid bekommen. Allerdings ist die Reaktion nicht ganz so einfach. So gibt z. B. das Diaminobuttersäurederivat *V* mit Triäthylphosphit eine Verbindung, die der Analyse nach anscheinend *VI* ist. Diese Verbindung ist jedoch sehr reaktionsträg und setzt sich mit Carbobenzoxycylin nicht leicht um. Wir haben aus Zeitmangel diese Sache nicht weiter verfolgt; aber ich glaube, diese Resultate genügten, um etwas theoretisches Interesse an dieser Reaktion zu erwecken.

Zum Abschluß möchte ich noch an Prof. Wieland die Frage richten, ob er unter den acylierten Heterocyklen, die er geprüft hat, nicht auch Acylpyrazole in sein Interessenbereich mit einbezogen hat, denn in letzter Zeit ist ja für normale Carbonsäuren die Herstellung der Acyldimethylpyrazole aus den Hydraziden mit Acetylaceton beschrieben worden [Ried W., Königstein F. J.: Angew. Chem. 70, 165 (1952)]. Wann die Verbindungen aminolysierbar wären, wäre das ein Umweg von Hydrazid zu Peptid. Ich habe nur so orientierungshalber, denn ich wollte eben erst darüber hier fragen, Carbobenzoxycylin mit Acetylaceton kondensiert und auch ein Produkt erhalten.

WIELAND: Da geht es Ihnen, wie es so oft in der Wissenschaft der Fall ist. Diese Methode, also die Herstellung von Acylpyrazolen, hat Herr Prof. Ried aus meinem Institut in Frankfurt ungefähr vor einem halben Jahr beschrieben, und da bei uns Peptide *en vogue* sind, hat er versucht, die Reaktion auf Carbobenzoxycylin zu übertragen und hat auch das N-Carbobenzoxycylin-pyrazol hergestellt und zur Peptidsynthese verwendet. Ich glaube in der Zwischenzeit hat er schon einige Di- und Tripeptide nach dem Verfahren hergestellt. Was hier einen Umweg

bedeutet, das ist, daß man zuerst den Ester haben muß, dann das Hydrazid, und aus dem Hydrazid macht man jetzt die wohl nicht schlecht kristallisierenden heterocyclischen Derivate. Aber von dem Hydrazid aus ist ja natürlich mit salpetriger Säure der Weg der Curtius-Methode sehr gut ausgearbeitet, es wird sich also vielleicht hier als Vorteil erweisen, wenn die Zwischenprodukte besser kristallisieren; denn die Azide sind ja nicht zu fassen.

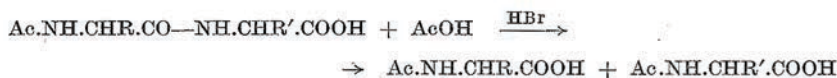
SCHENJAKIN: Ich möchte bemerken, daß in unserem Institut Frau Schtschukina mittels der Carbodiimidmethode einige O,N-Peptide der Hydroxyaminosäuren hergestellt hat. Sie hat verschiedene Hydroxyaminosäuren genommen, welche mit Aminen oder Aminosäuren amidiert waren, und hat mit Dicyclohexylcarbodiimid in Pyridin oder anderen tertiären Aminen in guter Ausbeute die entsprechenden O,N-Peptide erhalten. Die Peptide kann man sehr leicht in kristallinischer Form in 80–85% Ausbeute bekommen. Ich will auch bemerken, daß die Methode der gemischten Anhydride eine der besten ist — nicht nur im Falle der Aminosäureacylierung der Peptide, sondern auch bei ihrer Acylierung mit verschiedenen anderen Säuren. Wie einer von meinen Schülern, Herr Chochlov, gezeigt hat, führt die Acylierung mit Penicillin nur bei Anwendung dieser Methode zu kristallinen Amiden. Frau Schtschukina hat auch gezeigt, daß nur die Methode der gemischten Anhydride es ermöglicht, Dihydrosarcomycin-Peptide in kristallinischer Form zu erhalten. Alle anderen Methoden — die Chlorid-, Azid-, Carbodiimid-Methode und Methode der aktivierten Ester — führten zu negativen Resultaten. Wie wir jetzt wissen, kommen in der Natur viele acylierte Peptide vor, und da auch einige synthetische acylierte Peptide biologisch wichtig sind, ist es interessant, die Möglichkeit der Acylierung mit Anhydriden der Carbonsäuren nicht nur zur Aminoacyl-Peptidsynthese, sondern auch zur Acylierung mit verschiedenen anderen Carbonsäuren zu gebrauchen.

TASCHNER: Prof. Wieland hat über Diacylamide gesprochen. Nun haben wir schon vor einiger Zeit festgestellt [Taschner E., Kocor M., Mejer S.: *Roczniki Chem.* 26, 692 (1952); 32, 267 (1958)], daß die diacylierten Amine viel stärkere Acylierungsmittel sind als die monoacylierten. Die zweite Acylgruppe hat einen ausgesprochenen Einfluß. Wir haben dies bei Diacetyl- und Dibenzoylaminen beobachtet. Wenn man diese Amide in Toluol mit primären (nicht aber mit sekundären) Aminen erhitzt, erhält man die acetylierten oder benzoylierten Amine. Die Reaktion wird durch Protonen beschleunigt. Mit Hilfe solcher Amide haben wir auch verschiedene Cholesterolderivate verestert [Kocor M., Mejer S., Taschner E.: *Bull. Acad. Polon. sci. class. III* 6, 1 (1958)], wobei aber saure Katalysatoren unbedingt notwendig sind.

Wir haben noch einen anderen Weg gefunden, der zur „Synthese“ von Peptidbindungen führt, obwohl er vom präparativen Standpunkte aus wertlos ist [Taschner E., Kupryszewski G.: *Roczniki Chem.* 31, 711 (1957); Taschner E., Kupryszewski G.: *XVI<sup>me</sup> Congrès Internat. IUPAC* 2, 238 (1957); Kupryszewski G.: *Dissertation*, Technische Hochschule, Gdańsk 1958]. Wenn man nämlich acylierte Amine mit Bromwasserstoff in Eisessig unter wasserfreien Bedingungen einige Stunden auf etwa 100° erhitzt, so wird die Acylgruppe verdrängt und an ihre Stelle tritt die Acetylgruppe der Essigsäure.

Die N-acylierten Aminosäuren verhalten sich ebenso. Aus Benzoyl-glycin, Benzoyl-leucin und Benzoyl-phenylalanin entstehen die Acetylaminosäuren und Benzoesäure. Die Acetylgruppe kann auch durch die Trichlor- oder Trifluoroacetylgruppe ersetzt werden, und mit Essigsäure kann ein Austausch von Acetylgruppen stattfinden: aus acetylierten Aniliden oder Aminosäuren und Essigsäure-1-<sup>14</sup>C erhielten wir radioaktive Acetanilide oder Acetylaminosäuren (Ac-Gly und Ac-Phe).

Ebenso werden acetylierte Dipeptide in acetylierte Aminosäuren gespalten. Der Spaltungsgrad schwankt je nach der Natur des Dipeptides zwischen 72 und 95%.



Wenn die Essigsäure ein die Peptidbindung spaltendes Reagenz ist, so kann man nicht ausschließen, daß auch andere Säuren, z. B. acetylierte Aminosäuren, dieselbe Rolle spielen könnten. Es ist das nur die Frage eines geeigneten Lösungsmittels. Wenn das nun der Fall wäre, so hätten wir hier eine Synthese von Peptiden. Um diese Möglichkeit zu beweisen, erhitzen wir Acetyl-phenylalanin mit Essigsäure und Bromwasserstoff und konnten Acetyl-phenylalanyl-phenylalanin als Reaktionsprodukt chromatographisch einwandfrei identifizieren. Könnte diese Reaktion nicht den *in vivo* ununterbrochen verlaufenden Umbau, Aufbau und Abbau der Peptidketten vom chemischen Standpunkte aus teilweise erklären?

WIELAND: Ist die zweite Reaktion, die Herr Taschner erwähnt hat, das was man in der biologischen Peptidchemie eine Umacylierung nennt? Solche Reaktionen sind von Fruton und von Bergmann schon früher beschrieben worden. Unter dem Einfluß von Enzymen gibt es Austausch eines endständigen Aminosäurerestes gegen einen anderen — die klassischen Versuche mit Anilin zum Beispiel, die zu Aniliden führen, und so weiter.

TASCHNER: Die Reaktion von Fruton könnte eigentlich als eine Acylierung von Aminen aufgefaßt werden. Hier haben wir eine Umtauschreaktion, wo ein Acyl durch ein anderes verdrängt wird. Wir nennen diese Reaktion N-Transacylierung oder N-Acidolyse, zum Unterschied von der analogen Reaktion am Alkoholsauerstoff, die wir O-Transacylierung oder O-Acidolyse benennen.

Den Ab-, Auf- und Umbau der Peptidkette im biochemischen Geschehen könnte man sich dann folgendermaßen vorstellen:



Das Dipeptid greift das Tetrapeptid zwischen C und D an und in einem Reaktionsschritt entsteht ein höheres Peptid. Das spaltende Mittel ist gleichzeitig das sich einlagernde. Nach klassisch organischen Modellen verlangt solch eine Reaktion mehrere Schritte.

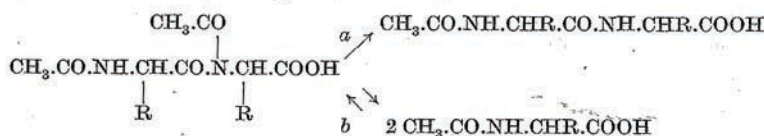
SORM: Wenn Sie diese Reaktion von Acetyl-phenylalanin in Essigsäure gemacht haben, haben Sie da auch höhere Peptide gefunden? Haben Sie das verfolgt?

TASCHNER: Nein.

SORM: Aber Sie sollten wohl dort sein, nicht?

TASCHNER: Ich glaube es entsteht eine Reihe von Peptiden verschiedener Länge, aber sie werden wahrscheinlich sofort wieder abgebaut. Wir haben das aber nicht verfolgt.

WIELAND: Ich habe mich vorhin geirrt, es hat dies natürlich nichts mit der Frutonschen Annahme zu tun, sondern es kommt viel näher auf das Problem heraus, mit dem auch wir uns beschäftigt haben und Herr Brenner auch. Es läuft darauf hinaus, daß in eine Amidogruppe einer Peptidbindung ein Acylrest von außen herhineingebracht wird. Wir haben die Vorstellung, es entstehe da ein Diacylimid und das kann dann in zwei Richtungen zerfallen: entweder so, daß die neue Acylgruppe wieder abfällt (a), oder so, daß die ursprünglich daran gebundene Gruppe abfällt (b). Auf diese Weise bekommen Sie dann ein Gleichgewicht. Sie haben ja auch gezeigt, daß Sie im Gleichgewicht 25% von dem einen und 75% von dem anderen bekommen.



TASCHNER: Wir haben versucht, in N-Methylacetanilid die Acetylgruppe gegen Essigsäure-1-<sup>14</sup>C umzutauschen [Kupryszewski G.: *Dissertation*, Technische Hochschule, Gdańsk 1958]. Wenn die Reaktion über eine Diacylverbindung ginge, so würde es zu keinem Umtausch kommen. Nun aber fand der Umtausch in hoher Ausbeute statt (80%), womit die Hypothese der intermediären Diacylamin-Bildung fallen gelassen werden mußte und ein direkter Umtausch plausibler erschien.

WIELAND: Ich finde es höchst interessant, daß unter diesen Bedingungen die Essigsäure als acylierendes Reagens wirkt. Das kommt eben von der hohen Protonenkonzentration des Bromwasserstoffs.

RUDINGER: Ich glaube, das System Bromwasserstoff-Eisessig ist nicht ganz so einfach wie es auf den ersten Blick aussieht. Wir haben z. B. versucht, Isoglutamin aus Tosylisoglutamin durch Abspaltung der Tosylgruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig zu erhalten. Unter Bedingungen, unter denen wir aus dem Tosylderivat des Glutamins ungefähr 80% an freiem Glutamin erhielten, darauf werde ich noch später zurückkommen — haben wir hier in sehr guter Ausbeute (gleichfalls ungefähr 80%) das Amid der Tosylpyroglutaminsäure erhalten. Es führt also die Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig — und wir haben das dann noch in einigen anderen Fällen beobachtet — die Tosyllactam-Cyclisierung sehr glatt und sauber durch. Ich glaube, diese Acylierungsreaktion hängt vielleicht auch mit den Reaktionen, über die Prof. Taschner berichtet hat, zusammen.

Wir haben auch gefunden, daß in Decarboxylierungen, in Fällen wo es sich um empfind-

liche Peptide handelt, das Alter der Bromwasserstoff-Eisessig-Lösung wichtig ist, auch wenn sie nicht feucht wird: wenn man sie etwa drei oder vier Wochen im Eisschrank aufbewahrt, erhält man viel schlechtere Resultate. Wir haben so den Gedanken gehabt, ob es sich da nicht um ein Gleichgewicht handelt, in dem etwa Acetylbromid oder Acetanhydrid entstehen könnte. Das würde dann die Interpretation solcher Versuche und deren Mechanismus vielleicht etwas komplizieren.

TASCHNER: Das ist ganz richtig. Wir haben immer wieder gezweifelt, ob die Reaktion nicht doch eine Hydrolyse wäre. Aus Essigsäure und Bromwasserstoff könnte ja Acetanhydrid und Wasser entstehen. Um dies völlig auszuschließen, haben wir Acetanilid mit trockener Trichloressigsäure ohne Bromwasserstoff erhitzt — Bedingungen unter welchen kein Wasser in der Reaktion entstehen könnte — und wir erhielten Trichloracetanilid. Dasselbe wurde auch mit Trifluoressigsäure wiederholt, wobei Trifluoracetanilid in 60% Ausbeute erhalten wurde.

ROTHE: Darf ich nur noch etwas ganz kurz zu den aktivierten Amidien sagen. Prof. Wieland hat vorhin erwähnt, daß Aminoacylamide nur in saurer Lösung bis zu pH 5 beständig sind; das stimmt natürlich bei den Derivaten der gewöhnlichen aliphatischen Aminosäuren, die im neutralen Medium aminolysieren; wenn man aber die Aminogruppe entsprechend schwach basisch macht, also beispielsweise den *p*-Aminobenzoessäurerest an ein Säureamid anfügt, dann sind diese Verbindungen auch im neutralen Gebiet beständig, man kann sie sogar aus Wasser umkristallisieren, z. B. *p*-Aminobenzoylcaprolactam



ZAORAL: Gestatten Sie mir eine kurze Bemerkung zur Anwendung von Tosylaminosäuren bei den Peptidsynthesen mittels der Methode der gemischten Anhydride. Aus eigenen Erfahrungen und aus der Literatur ist uns das anomale Verhalten der Tosylaminosäuren bekannt. Eine nähere Aufklärung dieser Tatsache wurde jedoch bisher nicht angeführt, nur Hillmann [Z. f. Naturforsch. 6b, 340 (1951)] erwähnt, daß der saure Wasserstoff der Tosylaminogruppe zu Nebenreaktionen führt. Da wir in unserem Laboratorium ziemlich oft mit Tosylaminosäuren arbeiten, wollten wir deren Verhalten bei den Anhydridsynthesen näher untersuchen. Wir haben deshalb auf verschiedene Weise eine ganze Reihe von Anhydridsynthesen mit den Tosylaminosäuren durchgeführt.

In erster Reihe wollten wir feststellen, ob der anomale Verlauf der Reaktion wirklich mit der Tosylaminogruppe zusammenhängt und nicht vielleicht durch die Tosylgruppe an sich verursacht ist. Deshalb haben wir unter identischen Bedingungen zwei Anhydridsynthesen durchgeführt, die erste mit Tosylsarkosin und die zweite mit Tosylglycin und Anilin. Das Produkt teilten wir in einen in Bicarbonat löslichen Anteil, in einen in Lauge löslichen Anteil und eine neutrale Fraktion auf. Die Synthese mit Tosylsarkosin verlief, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, in normaler Weise und wir isolierten das Anilid des Tosylsarkosins in 80% Ausbeute. Bei dem Tosylglycin wurde kein Tosylanilid isoliert, sondern die Reaktion führte in 80% Ausbeute zum Carbanilsäure-*sek*-butylester. Daraus geht hervor, daß die anomale Reaktion mit der Anwesenheit des Wasserstoffes in der tosylierten Aminogruppe zusammenhängt.

Bei der Wahl weiterer Versuche gingen wir von der Voraussetzung aus, daß dieser Verlauf der Anhydridsynthesen einerseits durch die Ionisierung der Tosylaminogruppe, andererseits durch ihre Reaktion mit dem Reagenz, eventuell mit dem gemischten Anhydrid, verursacht sein könnte. Wenn es wirklich so wäre, so müßte der Verlauf der Synthese von der Stärke der angewandten Base beeinflusst werden. Um dies zu klären, führten wir einige Anhydridsynthesen durch, in welchen wir als Reagenz Chlorameisensäure-*sek*-butylester oder Acetylchlorid und als Base *N*-Äthylpiperidin oder Pyridin benützten (Reaktionen 3, 5 und 6 in der Tabelle). In dem Versuche 3, wo als Reagenz der Chlorameisensäureester und als Base Pyridin verwendet wurde, wurde das Anilid des Tosylglycins in ungefähr 50% Ausbeute erhalten. Bei der Verwendung von *N*-Äthylpiperidin wurde jedoch kein Tosylglycin-anilid isoliert. Auch in Versuchen 5 und 6, mit Acetylchlorid, bekommt man in Gegenwart von Pyridin deutlich höhere Ausbeuten des Tosylglycin-anilids als in Gegenwart von *N*-Äthylpiperidin. Diese Ergebnisse sind also im Einklang mit der früher angeführten Voraussetzung, gestatten jedoch noch keine eindeutige Erklärung.

Die Tatsache, daß der Verlauf der Anhydridsynthesen mit Tosylaminosäuren auch durch die Reaktion des Reagenz mit der Tosylaminogruppe beeinflusst werden kann, wurde durch die Isolierung des *N*-Tosyl-*N*-acetylglycins aus den sauren Reaktionsanteilen der Versuche 5 und 6 bestätigt. Dieses Produkt war die überwiegende Komponente der sauren Anteile der Reaktion 7, bei der 2 Mol Base und 2 Mol Reagenz verwendet wurden.

Tabelle

Anhydridsynthesen mit Tosyl-aminosäuren  
Aminokomponente: Anilin.

No.	Tosyl-aminosäure	Base	Acylchlorid	Ausbeute, %	
				Tosyl-aminosäure-anilid	Acylanilid resp. Urethan
1	Tos-Sark-OH	N-Äthylpiperidin			
2	Tos-Gly-OH	N-Äthylpiperidin	Chlorkohlensäureester <sup>a</sup>	80	—
3	Tos-Gly-OH	Pyridin	Chlorkohlensäureester <sup>a</sup>	—	80
4	Tos-Gly-OH	Pyridin + N-Äthylpiperidin	Chlorkohlensäureester <sup>a</sup>	50	36
			Chlorkohlensäureester <sup>a</sup>	25	17
5	Tos-Gly-OH	N-Äthylpiperidin	Acetylchlorid	20	18
6	Tos-Gly-OH	Pyridin	Acetylchlorid	30	27
7	Tos-Gly-OH	Pyridin (2 Mol)	Acetylchlorid (2 Mol)	2	70
8	Tos-Gly-OH	Pyridin	Pivaloylchlorid	76	4
9	Tos-Leu-OH	N-Äthylpiperidin	Chlorkohlensäureester <sup>a</sup>	2	80
10	Tos-Leu-OH	Pyridin	Pivaloylchlorid	65	28

<sup>a</sup> sek-Butylester.

Auf Grund dieser Erkenntnisse bemühten wir uns in einigen orientierenden Versuchen solche Bedingungen zu finden, unter welchen die Reaktion zu präparativ nützlichen Ausbeuten führt. Wir verwendeten als Base Pyridin und als Reagenz Pivaloylchlorid. Wir setzten voraus, daß die Carbonylgruppe dieses Chlorids aus sterischen Gründen ausreichend passiv sein würde und daß dadurch sowohl die anomale Spaltung des gemischten Anhydrides, als auch die Acylierung der Tosylaminogruppe vermieden würde.

Bei der Reaktion des Tosylglycins in Gegenwart von Pyridin als Base und Pivaloylchlorid als Reagenz mit Anilin erhielten wir wirklich Tosyl-glycin-anilid in 76% Ausbeute und nur in 4% Ausbeute das Pivaloylanilid (Reaktion 8). Die Ergebnisse, die wir mit dem Tosylleucin erhielten, waren nicht so befriedigend. Neben 65% Tosyl-leucin-anilid wurde Pivaloylanilid in 28% Ausbeute erhalten.

Wir führten dann einen Versuch zur Synthese eines Peptids durch und zwar die Synthese des Tosyl-leucyl-glycin-äthylesters. Die Reaktion ging glatt vor sich und den geschützten Peptid-ester erhielten wir in 73% Ausbeute. Die Entstehung des Pivaloyl-glycin-äthylesters wurde nicht beobachtet.

In keiner der Reaktionen, bei denen Pivaloylchlorid verwendet wurde, konnten wir die Acylierung der Tosylaminogruppe feststellen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in günstigen Fällen auch die Tosylaminosäuren zu Anhydridsynthesen der Peptide verwendet werden können.

YOUNG: We have discussed methods of coupling in simple cases, but too often when one applies them in complicated cases one has to experiment with several methods before finding one which is successful. The particular case I have in mind is this: We were attempting to couple  $\beta$ -benzyl carbobenzoxy-aspartate with an  $\epsilon$ -protected lysine benzyl ester; we tried the carbonic mixed anhydride method of coupling, and several phosphite methods of coupling, and the yields were extremely poor. However, when we converted the  $\beta$ -benzyl carbobenzoxy-aspartate into the mixed anhydride and then allowed that to react with *p*-nitrothiophenol to form the *p*-nitrophenylthioester, that coupled with our lysine ester almost quantitatively to give a coupling product in a very satisfactory fashion. We had obviously been successful in overcoming the hindrance of the amino group of the rather bulky lysine residue in that way. Unfortunately, in this particular case our attempts were frustrated because we could no longer use catalytic hydrogenation to remove our protecting groups because of the presence of sulphur, and hydrogen bromide in acetic acid have us a considerable amount of the imide derivative with both the  $\alpha$  and  $\beta$  carboxyls of aspartic acid coupled. So it didn't really help in the end. But the point that I am trying to make by this example is how useful it is if authors will report their failures as well as their successes and I think only in that way shall we accumulate enough experience to be able to try to choose the best way of coupling in a synthesis of a larger peptide of this kind.

BRENNER: Dr Young, you mentioned that you could no longer remove the benzyl groups by hydrogen on palladium because of the sulphur present. Is that so serious? Can you not purify the product and remove the sulphur?

YOUNG: No, using *p*-nitrothiophenol one obtains appreciable amounts of the disulphide, di-*p*-nitrophenyl disulphide, and we found it impossible to get rid of all traces. We could never obtain the material pure enough to hydrogenate satisfactorily.

RUDINGER: Did you try Raney nickel?

YOUNG: We tried Raney nickel, yes.

RUSSELL: Did you try to use peracetic acid and oxidise it?

YOUNG: Not peracetic acid, but we tried hydrogen peroxide. We did try oxidising it both with bromine and with permanganate and still the catalyst was poisoned.

WÜNSCH: Dr. Young hat mit der Thioestermethode die Erfahrung gemacht, daß nachher eine hydrogenolytische Entacylierung mit katalytisch erregtem Wasserstoff Schwierigkeiten bringt. Dasselbe tritt unter anderem auch bei der Phosphorazomethode ein. Bei diesem Verfahren kann man beim Aufarbeiten des Reaktionsgemisches den eigenartigen Geruch von Phosphorwasserstoffen wahrnehmen, scheinlich bedingt durch eine Disproportionierung der entstandenen metaphosphorigen Säure. Es ist sehr schwierig selbst durch Umkristallisieren diesen Geruch von den Carbobenzoxypeptid-estern wegzubringen. Vor allem bei Benzylestern hat man größte Schwierigkeiten, die Schutzgruppe später abzuhydrieren.

RUDINGER: Es gibt noch eine Methode zur Knüpfung von Peptidbindungen die, glaube ich, etwas mehr Aufmerksamkeit verdient — das ist die Benützung von N-Carboxyanhydriden in der Oligopeptidsynthese. Es schien uns, daß der größte Nachteil der Methode darin liegt, daß das Produkt ein Dipeptidester ist, der zum Diketopiperazin cyclisieren kann. Wir haben die Reaktion gewöhnlich so benützt, daß wir den Dipeptidester ohne Isolierung *in situ* mit einer dritten, acylierten Aminosäurekomponente zur Reaktion gebracht haben. Diese Reaktion geht manchmal sehr gut — aber manchmal geht sie auch sehr schlecht. Ich habe den Eindruck, daß wir viel zu wenig darüber wissen, unter welchen Bedingungen bei den verschiedenen N-Carboxyanhydriden erstens die Ringöffnungsreaktion und zweitens die Decarboxylierung stattfindet. Es würde mich sehr interessieren, ob hier jemand mit dieser Sache Erfahrungen hat. Wie schon Leggett Bailey betont hat, wäre das eine sehr schöne Methode, wenn sie gute Ausbeuten gäbe, weil man da einfach eine Aminosäure an die andere reihen könnte. Ich weiss von keiner systematischen Untersuchung der Reaktivität. Es gibt eine Arbeit über Polymerisierung, die sich mit der Reaktivität befaßt, aber die scheint etwas fraglich: Es wird dort danach auf die Reaktionsfähigkeit geschlossen, wie schnell sich das Polypeptid aus der Lösung ausscheidet, ohne daß man darauf achtet, daß die entsprechenden Polypeptide verschiedener Aminosäuren verschieden löslich sein könnten. Die Polymerisierung ist ja oft kinetisch analysiert worden, nach der Kohlendioxidabspaltung, viskosimetrisch usw., besonders von den englischen Autoren, aber dies war eine neuere Arbeit, die ist auch voriges Jahr auf dem Symposium für makromolekulare Chemie hier vorgetragen worden. Dieselben Autoren haben auch die N-Carboxyanhydridbildung nach der Geschwindigkeit der Lösung der suspendierten Aminosäure „kinetisch“ analysiert. Jetzt wissen wir aber selbst, daß z. B. das S-Benzylcystein oder das Phenylalanin sehr schnell in Lösung gehen, weil sie eben schon selbst in Tetrahydrofuran oder Dioxan ziemlich löslich sind, während Glycin sehr langsam in Lösung geht. Ich glaube, man kann daraus durchaus keine Schlüsse über die Reaktionsfähigkeit ziehen.

WIELAND: Meinen Sie die Arbeit von Heyns?

RUDINGER: Ja.

GOLDSCHMIDT: Man bekommt ja da sehr verschiedene lange Ketten; wenn man mit Alkohol extrahiert, kann man niedere Peptide herauslösen.

RUDINGER: An diesen Polypeptidynthesen waren wir nicht direkt interessiert, wir hatten nur gedacht, daß sie nützliche Information über die Reaktivität der N-Carboxyanhydride geben könnten, aber ich glaube, das tun sie eben nicht.

WIELAND: Haben Sie nach dem Baileyschen Verfahren den Ester einer Aminosäure mit dem N-Carboxyanhydrid in Gegenwart von Triäthylamin kondensiert?

RUDINGER: Ja, wir haben N-Äthylpiperidin als Base benützt, aber ansonsten gleich gearbeitet. Gewöhnlich sind wir allerdings gleich auf das Tripeptid weiter gegangen.

WIELAND: Wie steht es mit Racemisierung dabei?

RUDINGER: Wir haben versucht das N-endständige Tripeptid des Oxytocins so herzustellen, das war der Fall, den wir am besten studiert haben [Honzl J., Rudinger J.: Diese Zeitschrift 20, 1190 (1955)]. Das N-Carboxyanhydrid des O-Acetyltyrosins ist sehr bequem zugänglich, und

krystallin. Wir haben es in einem Modellversuch mit Glycinäthylester kondensieren lassen, und dann mit N-Tosyl-S-benzylcysteinchlorid acyliert. Mit dem Glycin geht das ganz gut, und das Produkt ist mit einem durch die Azidsynthese hergestellten identisch und demnach anscheinend nicht racemisiert. Mit dem Leucinäthylester geht diese Synthese viel schlechter, und mit dem Isoleucin haben wir es schon überhaupt nicht mehr versucht, weil es uns um das teure Material leid war. Es ist natürlich zu erwarten, daß die Größe der Seitenkette dieser Aminosäure auch ein Faktor bei der Reaktion sein wird.

GOLDSCHMIDT: Diese Erfahrung haben wir auch gemacht. Sie polymerisieren außerordentlich verschieden — bei den einfachen zum Teil schon beim Liegen der Kristalle.

RUDINGER: Besonders wenn sie unrein sind.

BRENNER: Herr Rothe, ist da nicht eine Arbeit von Langenbeck, mit der Behauptung diese Methode sei gut?

ROTHE: Diese Versuche sind wohl nicht zuende geführt worden.

RUDINGER: Langenbeck [J. prakt. Chem. 2, 261 (1955)] hat Tribenzylamin als Base benützt.

ROTHE: Ja, dadurch sollte die Schwerlöslichkeit des Reaktionsproduktes infolge Vergrößerung des Moleküls gewährleistet werden. Das erhielt man in einigen, aber durchaus nicht in allen Fällen. Aber Bailey hat wahrscheinlich aus demselben Grund Trioktylamin verwendet. Das gibt auch nicht in allen Fällen schwer lösliche Salze. Daß man bei der Methode ein Anhydrid nach dem anderen nach Ende der Reaktion zugeben kann — das geht auch nicht so gut, wie von Mitarbeitern von Prof. Langenbeck versucht worden ist. Der Umsatz ist nicht quantitativ, und dann bekommt man ja große Mengen an Nebenprodukten.

RUDINGER: Das ist ja eine Frage der Arithmetik; bei allen solchen Methoden, nach denen wir wohl alle Umschau halten, muß man wirklich in jeder Stufe sehr hohen Umsatz haben damit die Verunreinigungen das nicht unmöglich machen.

HONZL: Ich möchte einige Worte über eine Besonderheit der Azidsynthese sagen. Die Vorteile dieser Methode sind allgemein bekannt. Unter den Nachteilen sind einerseits Schwierigkeiten manipulativer Art, zum Beispiel die Verschiedenheit der optimalen Bedingungen in einzelnen Fällen, und andererseits die Möglichkeit von Nebenreaktionen.

Der Curtius'sche Abbau von Aziden ist hier nur verhältnismäßig selten beobachtet worden. Es gibt aber eine stöchiometrisch etwas überraschende Reaktion, bei der das dem Hydrazid entsprechende Amid entsteht, die schon öfters verzeichnet worden ist, besonders bei Hydraziden die S-Benzylcystein enthalten. Im Allgemeinen wird in der peptidsynthetischen Literatur angenommen, daß es sich um eine Zerfallsreaktion des fertigen Azids handelt, etwa eine hydrolytische Reaktion nach der Gleichung



Es ist aber auch möglich, daß es um eine Reaktion des Hydrazids selbst geht, analog der aus der anorganischen Chemie bekannten



Hier würde man also die Entstehung eines Zwischenproduktes, vielleicht eines Nitrosohydrazids, erwarten das sich dann entweder unter Verlust von Wasser zu dem Azid, oder mit Verlust von Distickstoffmonoxyd zu dem Amid zersetzen könnte.

Wir haben einige orientierende Versuche mit der Cyclohexancarbonsäure gemacht, bei der die Entstehung von Amid auch verzeichnet ist. Wird das Hydrazid in saurer Lösung bei etwa  $-15$  bis  $-20^\circ$  mit Nitrit behandelt, entsteht ein weißer, sehr instabiler Niederschlag, der sich beim Abnutzen sofort zersetzt. Dabei entsteht das Amid in 6% Ausbeute. Wenn aber die Reaktionsmischung mit Äther extrahiert wird, dann werden aus der Ätherlösung nur 0,8% Amid isoliert. Wird die Reaktion des Hydrazids mit salpetriger Säure bei 0 bis  $-5^\circ$  durchgeführt und das Produkt mit Äther extrahiert, entstehen nur Spuren von Amid. Und wird schließlich das Azid der Cyclohexancarbonsäure aus dem Säurechlorid und Natriumazid hergestellt, und dann so wie zuvor verarbeitet, so können nicht einmal Spuren von Amid nachgewiesen werden.

Diese natürlich nur ganz vorläufigen Versuche deuten darauf hin, daß die Entstehung des Amids mit der Reaktion des Hydrazids mit salpetriger Säure verbunden ist.

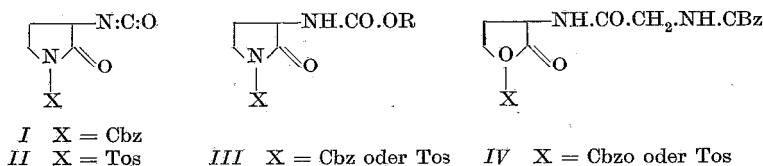
BRENNER: Wenn ich recht verstanden habe, bekommen Sie umso mehr Amid, je kälter Sie arbeiten?

HONZL: Nein, es hängt von der Art der Zersetzung des instabilen Niederschlags ab. Wenn man ihn isoliert und außer Kontakt mit der Flüssigkeit zersetzen läßt, bekommt man mehr

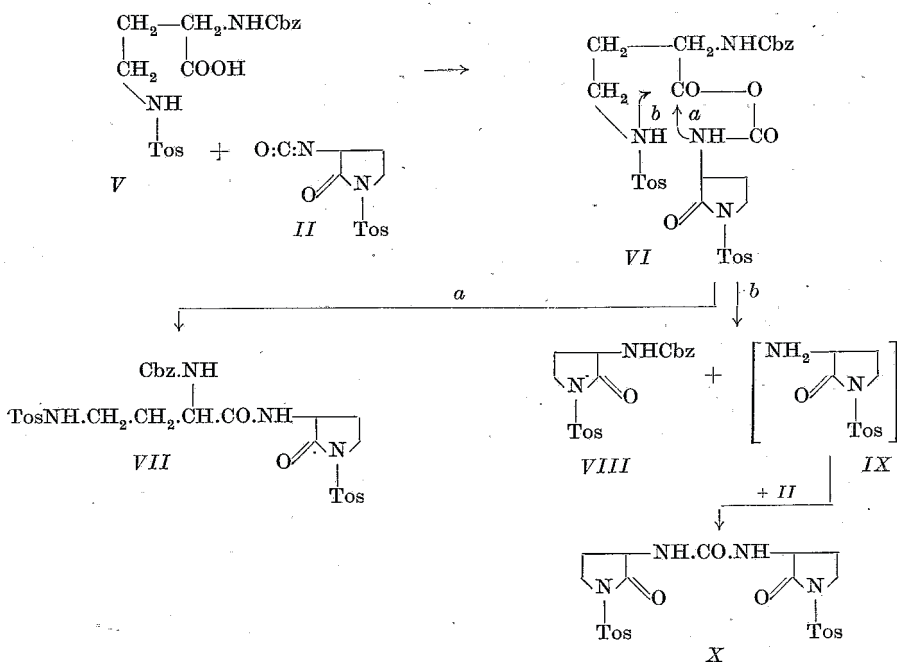
*Aktivierung der Carboxyl- und Aminogruppe*

Amid. Wird der Niederschlag mit Äther extrahiert, bekommt man bei seiner Zersetzung hauptsächlich Azid. Ob der Niederschlag überhaupt ein Zwischenprodukt ist, das können wir noch nicht mit Sicherheit behaupten. Es handelte sich darum, zu entscheiden, ob es um eine Reaktion des fertigen Azids ging oder um den Verlauf der Reaktion des Hydrazids mit salpetriger Säure. Bei dem Versuch mit Erwärmung ist es überhaupt nicht zur Bildung eines Niederschlags gekommen, es entsteht gleich das ölige Azid.

PODUŠKA: Ich hätte eine Bemerkung zu der Isocyanatsynthese bzw. zu einigen Schwierigkeiten, die wir in einem besonderen Fall angetroffen haben. Durch die Reaktion von *N* $\gamma$ -Carbobenzoxy- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure mit Phosgen haben wir das Leuchs'sche Anhydrid erhalten. Bei der Behandlung mit trockenem Chlorwasserstoff geht dieses in 1-Carbobenzoxy-3-aminopyrrolid-2-on über, und durch weitere Reaktion mit Phosgen wird nun das Oxopyrrolidylisocyanat *I* erhalten [Poduška K., Rudinger J.: Diese Zeitschrift 22, 1283 (1957)]. Durch dieselbe Reaktionsfolge haben wir auch aus *N* $\gamma$ -Tosyl- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure das entsprechende Tosylderivat *II* hergestellt.



Diese Stoffe sind also leicht zugänglich. Sie sind dabei dadurch interessant, daß sie sowohl die Carboxylgruppe, als auch die  $\alpha$ -Aminogruppe des ursprünglichen Diaminobuttersäurederivats im aktivierten Zustande enthalten.



Die Reaktion dieser beiden Isocyanate mit Alkoholen ergab die entsprechenden Alkyloxycarbo-nylderivate *III* in beinahe quantitativer Ausbeute. So haben wir nicht nur das Carbobenzoxyderivat (R = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), sondern auch die *tert*-Butoxycarboxylverbindungen (R = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) dargestellt. Die synthetische Reaktion mit Acylaminsäuren nach Goldschmidt verlief aber nicht so glatt. Nach der Reaktion des Isocyanats *I* mit Carbobenzoxyglycin isolierte ich das 1-Carbo-

benzoxy-3-carbobenzoxyglycylaminopyrrolid-2-on (IV) in nur 50%iger Ausbeute und im Falle des Tosylderivats II sank die Ausbeute auf 25%. Nach der Reaktion des Isocyanats II mit der N<sup>α</sup>-Tosyl-N<sup>γ</sup>-carbobenzoxydiaminobuttersäure (V) war ich überhaupt nicht imstande, das gewünschte Reaktionsprodukt VII zu isolieren. Aus dem Reaktionsgut konnte das 1-Tosyl-3-carbobenzoxyaminopyrrolidon (VIII) und daneben das von dem Aminopyrrolidon IX abgeleitete symmetrische Harnstoffderivat X isoliert werden. Da es bei dieser Reaktion zu einer stürmischen Kohlenstoffdioxyd-Entwicklung kommt, ist es wahrscheinlich, daß hier das erwartete Zwischenprodukt VI entsteht, das sich dann auf zweierlei Weise zersetzen kann: (a) Unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung und Entstehung des gewünschten Produktes, oder auch (b) unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung und Bildung von zwei Pyrrolidonderivaten — dem Tosyl-carbobenzoxyamino-pyrrolidon VIII und dem Aminopyrrolidon IX. Das Harnstoffderivat X könnte dann durch Reaktion des Amins IX mit unverändertem Isocyanat II entstehen. Für solch einen Zerfall des Zwischenproduktes zeugt auch die Tatsache, daß die N<sup>γ</sup>-Tosyl-N<sup>α</sup>-carbobenzoxydiaminobuttersäure unter den Bedingungen der Anhydridsynthese dieses Pyrrolidon VIII beinahe quantitativ ergibt [Poduška K., Rudinger J.: loc. cit.]. Die niedrigen Ausbeuten der Reaktion von Carbobenzoxyglycin mit den Isocyanaten I und II können leider durch diesen Reaktionsverlauf nicht erklärt werden.

GOLDSCHMIDT: Es ist interessant, daß das Isocyanat hier nicht reagiert.

RUDINGER: Es reagiert ja — es entsteht Kohlendioxyd.

PODUŠKA: Die Reaktion ist sogar sehr stürmisch. Nach einigen Minuten erstarrt die ganze Masse.

RUDINGER: Die Reaktion verläuft nur in der falschen Richtung. Wir glauben, daß sich dieses Zwischenprodukt VI — das Anhydrid der Carbaminsäure — bildet. Bei der normalen Isocyanatsynthese entsteht ja auch so ein Zwischenprodukt, R.CO.O.CO.NH.R'. Ich weiß nicht, was Ihre Ansicht ist — ob Sie der Meinung sind, daß sich dieses Zwischenprodukt intramolekular, durch ein O → N Acylmigrierung zersetzt, oder ob Sie die weitere Reaktion für intermolekular halten. Jedenfalls gibt es in diesem Fall, wo R der Rest der N<sup>γ</sup>-Tosyl-N<sup>α</sup>-carbobenzoxydiaminobuttersäure (V) ist, zwei Möglichkeiten: Wenn das Anhydridcarbonyl mit dem Aminstickstoff nach (a) reagiert, so wäre das der normale Verlauf der Isocyanatsynthese, und der ginge über einen Vierling. Aber es gibt hier auch die Möglichkeit einer Fünfring-Bildung, durch Angriff der γ-Tosylaminogruppe auf das Anhydridcarbonyl nach (b), und wir glauben eben, daß hier statt der normalen Reaktion (a) diese Reaktion (b) stattfindet. Dadurch entsteht Amin, das dann mit weiterem Isocyanat in einer Konkurrenzreaktion zum Harnstoffderivat reagiert.

GOLDSCHMIDT: Ja, es ist ja bekannt, daß die Isocyanate mit Aminen reagieren.

RUDINGER: Es ist also nur die Frage, wie das freie Amin dort entsteht; und wir glauben, es entsteht eben durch „falsche“ Spaltung des intermediären Anhydrids. Wir wissen nämlich, daß normale gemischte Anhydride dieser Tosyl-carbobenzoxy-diaminobuttersäure (V) zur Peptidsynthese praktisch unbrauchbar sind, da sie eben quantitativ zu diesem Pyrrolidonderivat (VIII) cyclisieren, und es ist ja schließlich das erste Produkt dieser Isocyanatsynthese auch so ein Anhydrid.

GOLDSCHMIDT: Es muß eben nicht immer normal gehen; auch in der Literatur sind Reaktionen beschrieben, die anders verlaufen.

RUDINGER: Wir hatten uns ziemlich viel von diesen Isocyanaten versprochen, denn sie sind sehr leicht zugänglich und kristallin und sie sind ja auch bei manchen Synthesen brauchbar, aber es hat sich gezeigt, daß leider der Reaktionsverlauf eben mit Acylaminosäuren hier nicht glatt genug ist, um nützlich zu sein.

## RACEMISATION DURING PEPTIDE SYNTHESIS

G. T. YOUNG

*The Dyson Perrins Laboratory, University of Oxford*

The major difficulty in the synthesis of peptides undoubtedly lies in the purification of the intermediates, and the most persistent contaminants are likely to be the stereoisomers formed if racemisation occurs during coupling. The general nature of this danger has been appreciated only recently, but I shall hope to show that the problem is indeed a real one.

In the initial investigations of the carbonic mixed anhydride method of coupling<sup>1-3</sup>, it was shown that benzyloxycarbonylamino-acids retain their configuration during the reaction, but Vaughan<sup>4</sup> later reported that the condensation of benzyloxycarbonylglycyl-L-leucine and -L-phenylalanine with glycine esters could, under certain conditions, lead to racemic products. He found a marked solvent effect; in the latter reaction, for example, when a mixture of toluene and chloroform was used as solvent, racemisation was nearly complete, but with tetrahydrofuran as solvent no racemate was detected. Synthesis from benzyloxycarbonylglycine and L-phenylalanyl-glycine ethyl ester gave fully active material. Again, when the carbonic mixed anhydride of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanine was formed in anhydrous tetrahydrofuran and allowed to react with an aqueous solution of the sodium salt of glycine, partial racemisation occurred, although dibenzyloxycarbonyl-L-lysine coupled with L-valine under similar conditions to give a fully active product<sup>5</sup>. These experiments showed that the extent of racemisation depends on the nature of the adjacent acyl group, and that the most common amino-protecting group, benzyloxycarbonyl, hinders racemisation of the residue to which it is attached. A striking illustration of this fact is that whereas benzoyl-L-leucine is rapidly racemised by treatment with acetic anhydride and alkali, benzyloxycarbonyl-L-leucine retains its activity under these conditions. This is, I suppose, an unforeseen virtue of Bergmann's protecting group, but a most valuable one.

It is clearly desirable that a method of condensation should preserve the configuration when acylpeptides are further coupled, and several such methods have been examined with this point in mind. In trying to summarise the rather complicated literature, I shall confine my attention to those experiments in which a deliberate search for racemate has been made; the isolation of a good yield of fully active material is not sufficient to show that no racemisation has occurred, and in elaborate syntheses even traces of diastereoisomer may prove extremely troublesome. In some of the experiments summarised in Table I, only very small amounts of racemate were detected, and the original papers must be consulted for details.

Anderson and his co-workers<sup>6-8</sup> have studied their methods involving phosphorous anhydrides and amines, using the same benzyloxycarbonyldipeptides as Vaughan. There was a large variation in the degree of racemisation encount-

Young:

Table I

A Summary of the Results of Racemisation Tests using Benzyloxycarbonyldipeptides

Coupling Method	Solvent (Procedure)	Amino-component added as	Race-mate found	Ref.
Carbonic mixed anhydride	toluene	free ester	+	4
	toluene-chloroform	free ester	+	4
	toluene-dioxan	free ester	+	4
	dioxan	free ester	+	4
	tetrahydrofuran	free ester	-	4
	chloroform	ester hydrochloride with triethylamine	+	4
	toluene-chloroform	ester hydrochloride with triethylamine	+	4
	tetrahydrofuran-water	sodium salt	+	5
<i>o</i> -Phenylene phosphorochloridite	benzene (anhydride)	free ester	-	6
Ethylene phosphorochloridite	diethyl phosphite (standard)	ester hydrochloride with triethylamine	+	8
	diethyl phosphite (amide)	ester hydrochloride with triethylamine	+	8
	diethyl phosphite (anhydride)	ester hydrochloride with triethylamine	+	8
Ethyl phosphorodichloridite	diethyl phosphite (standard)	ester hydrochloride with triethylamine	+	8
	benzene (amide)	ester hydrochloride with triethylamine	+	8
	benzene (anhydride)	ester hydrochloride with triethylamine	-	8
	trialkyl phosphite (standard)	ester hydrochloride	+	8
Tetraethyl pyrophosphite	diethyl phosphite (standard)	ester hydrochloride with triethylamine	+	7
	diethyl phosphite (standard)	ester hydrochloride	+	7
	diethyl phosphite (amide)	ester hydrochloride with triethylamine	+	7
	diethyl phosphite (anhydride)	ester hydrochloride with triethylamine	+	7
	diethyl phosphite (standard)	free ester	-	7
	diethyl phosphite (amide)	free ester	-	7
	diethyl phosphite (anhydride)	free ester	+	7
	tetrahydrofuran (standard)	free ester	-	9

*Racemisation*

Table I  
*continued*

Coupling Method	Solvent (Procedure)	Amino-component added as	Race- mate found	Ref.
Sulphuric mixed anhydride	water, pH 8	sodium salt	+	11
	water, pH < 6.8	sodium salt	+	11
	dimethylformamide	ester hydrochloride with triethylamine	-	11
<i>p</i> -Nitrophenyl thiol ester <sup>a</sup>	dioxan-water, MgCO <sub>3</sub>	dipeptide	+	12
Phosphorazo	pyridine	ester hydrochloride	+	16
Carbodiimide	tetrahydrofuran	free ester	+	9
	methylene chloride	free ester	+	9
N,N'-Carbonyldiimidazole <sup>b</sup>	dimethylformamide	free ester	+	21

<sup>a</sup> Prepared *via* phosphorotriothioite. <sup>b</sup> Added to the script.

ered, according to conditions, and with regard to the use of tetraethyl pyrophosphite they conclude that "both heating of the mixed anhydride and the presence of a hydrochloride may cause racemisation"<sup>7</sup>. Discussing the use of phosphorochloridites, they conclude that "racemisation when using the dipeptide acid has been observed using phosphite reagents only when reactions were performed in diethyl or trimethyl phosphite in the presence of hydrogen chloride, either free or bound as the hydrochloride. No racemisation is observed in using dipeptide acids in the absence of hydrogen chloride, as in pyrophosphite reactions or with chlorophosphite when triethylamine in inert solvents like benzene or toluene is used"<sup>8</sup>. I shall return to this point when discussing our own results, but here it must be noted that the 17% of racemate which Anderson, Blodinger, and Welcher isolated (reference<sup>7</sup>, p. 5310, Table 2.) by the use of tetraethyl pyrophosphite in the "anhydride" procedure, with distilled ester, is an exception to the above generalisation.

Kenner and his co-workers<sup>10,11</sup> have made a careful search for racemisation when the complex of sulphur trioxide with dimethylformamide is used as the condensing agent in the reaction of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanine with glycine and of benzyloxycarbonylglycyl-L-alanine with L-phenylalanyl-glycine. The latter is considered to be the more stringent test, as very small amounts of the diastereoisomer formed by racemisation of the alanyl residue could be detected by counter-current distribution. In aqueous solutions, the amount of racemisation depended greatly on the pH, becoming very slight at pH 6.8, and none was detectable (by crystallisation) when the corresponding esters were acylated in anhydrous dimethylformamide solution.

The preparation of the *p*-nitrophenyl thiol ester of benzyloxycarbonylglycyl-phenylalanine through the carbonic mixed anhydride gave completely racemic

product, and Farrington, Hextall, Kenner, and Turner<sup>12</sup> therefore developed a preparation of thiol esters in which tri-*p*-nitrophenyl phosphorotrithioite reacts with the carboxylic acid or its lithium salt; the thiol esters were then condensed with amino-acids in aqueous dioxan or tetrahydrofuran, in the presence of magnesium carbonate. Although benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanyl-glycine could be obtained in high yield by this route, the condensation of benzyloxycarbonylglycyl-L-alanine with L-phenylalanyl-glycine gave some 30% of the DL-product; this reaction seems especially sensitive.

Other methods of coupling have been investigated less extensively. The condensation of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanine with glycine ethyl ester by the action of dicyclohexylcarbodiimide in tetrahydrofuran solution gave a good yield of fully active product<sup>13</sup>, and similarly the coupling of formyl-L-phenylalanine with glycine anilide (which gave racemic product by the carbonic mixed anhydride procedure) gave active material<sup>14</sup>, but until the

Table II  
The Coupling of Acetyl-L-leucine with Glycine Ethyl Ester

Method	Ester added as	Solvent	Racemate found	Product <sup>c</sup>
Acid azide Cyanomethyl ester Carbodiimide	free base	ether	—	A
	free base	ethyl acetate	— <sup>a</sup>	—
	free base	tetrahydrofuran	+ <sup>b</sup>	A
	free base	methylene chloride	+ <sup>b</sup>	A
	free base	dimethylformamide	+ <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>
	free base	tetrahydrofuran— water (75/25, v/v)	+	B
Tetraethyl pyrophosphite—anhydride procedure	hydrochloride	diethyl phosphite	+	B
	free base	diethyl phosphite	+	B
Tetraethyl pyrophosphite—amide procedure	hydrochloride	diethyl phosphite	+	B
	free base	diethyl phosphite	+	B
Diethyl phosphorochloridite—anhydride procedure	hydrochloride	toluene	+	C
	free base	toluene	+	A
Diethyl phosphorochloridite—amide procedure	free base	ether, toluene	—	—
Carbonic mixed anhydride	hydrochloride	tetrahydrofuran	+	C
	hydrochloride	chloroform	+	C
Phosphorazo	hydrochloride	pyridine	+	C
Acid chloride	free base	chloroform	+ <sup>c</sup>	C
	free base	ether	+ <sup>c</sup>	C

<sup>a</sup> The bulk of the product was a syrup. <sup>b</sup> Detected after recrystallisation of the first fraction.

<sup>c</sup> A, chiefly L-isomer; B, a considerable proportion of racemate; C, chiefly racemate.

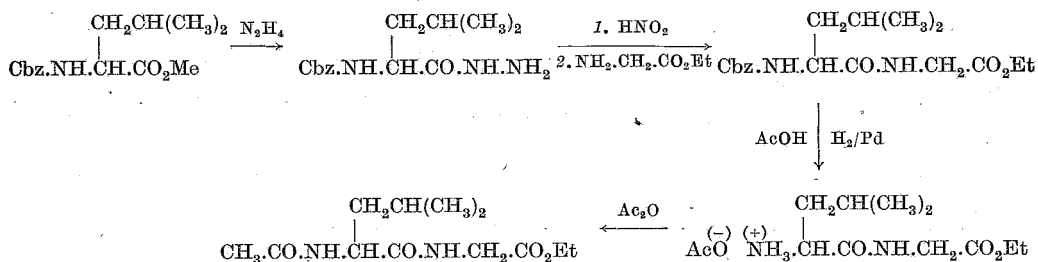
<sup>d</sup> Estimation of the L-isomer is complicated in this case by the presence of a considerable amount of acylurea.

recent report by Anderson and Callahan<sup>9</sup> (see below) no rigorous search for racemate had been reported. Goldschmidt and his co-workers<sup>15</sup> have described the use of the "phosphorazo" method for the coupling of active benzyloxy-carbonyl-amino-acids and -peptides, including examples in which the amino-component is asymmetric, but until very recently<sup>16</sup> (see below) there had been no report of a search for racemate when this procedure had been used to couple acylpeptides in which the residue with the free carboxyl group is asymmetric. Although there are many examples of the preparation of optically active peptides by the important route *via* cyanomethyl esters, no critical search for racemate has yet been recorded. Such tests of general applicability are still lacking for the interesting methods which use alkoxyacetylenes and their derivatives for coupling<sup>17</sup>.

My own interest in this problem started four years ago, when it was clear that a systematic examination of this aspect of all coupling procedures was highly desirable, and my colleague in nearly all this work has been Mr. N. A. Smart. The use of benzyloxycarbonylpeptides is laborious, and we chose a simpler model reaction for our investigations, the condensation of acetyl-L-leucine with glycine ethyl ester. Acetyl-L-leucine can easily be purified<sup>18</sup>, acetyl-L-leucylglycine ethyl ester has a high specific rotation, and the racemate crystallises readily. Preliminary accounts of some of the early work have appeared<sup>19</sup>.

Our work is still continuing, but in the hope that an interim report of our results to date may be of interest I have prepared a brief summary, shown in Table II.

Our procedure has been to examine the first crystalline fraction obtained from the coupling product, and by its specific rotation and melting point to determine whether any racemate is present; if racemate be may formed, it will normally appear in the first fraction. From the specific rotation of all the fractions, the percentage of L-isomer in the total product may be estimated, but since much of the material may remain as a syrup too much reliance should not be placed on these figures; in the Table the degree of racemisation has been evaluated semi-quantitatively. Acetyl-L-leucylglycine ethyl ester was synthesised by the sequence of reactions, chosen to avoid the possibility of racemisation, shown in the flow-sheet below; in contrast to the racemate (m. p. 120.5°), it does not crystallise well. The pure L-isomer has  $[\alpha]_D^{16} -56.0^\circ$  (c 1.0 in ethanol) and melting point 101°.



It is seen that we found no racemate when the acid azide or cyanomethyl ester methods were used in this reaction. When dicyclohexylcarbodiimide was used in tetrahydrofuran, methylene chloride, or dimethylformamide solution, a small amount of racemate was detected; when aqueous tetrahydro-

furan was the solvent the first fraction consisted largely of the DL-product, and the overall activity was also low. It may be noted here that Anderson and Callahan have very recently reported<sup>9</sup> the isolation of 6.6—8.2% of racemate during the preparation of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester by this method, in tetrahydrofuran solution; with methylene chloride as the solvent, 12% of DL-product was obtained. From enzymic evidence, some racemisation is deduced to have occurred when benzyloxy-carbonyl-L-histidyl-L-phenylalanyl- $\omega$ -nitro-L-arginine was coupled with L-tryptophylglycine benzyl ester by the carbodiimide method, in dimethylformamide solution<sup>20</sup>. The quantitative interpretation of our results is complicated in this case by the presence of the optically active acylurea, which was identified in the products of the reaction when dimethylformamide was the solvent.

The carbonic mixed anhydride method, using the ester hydrochloride with triethylamine, gave fractions rich in racemate even when tetrahydrofuran was the solvent, and the "phosphorazo" and acid chloride methods gave similar results. The fact that racemisation of the acylating residue may occur even in the phosphorazo method was first reported in our preliminary communication<sup>19</sup>, and has been confirmed by the recent work of Grassmann, Wunsch, and Riedel<sup>16</sup>, in the condensation of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanine with L-alanine methyl ester by the phosphorazo method.

The results with the methods involving phosphorous esters need some discussion. When tetraethyl pyrophosphite was used as the condensing agent, and the amino-component was added as a mixture of the ester hydrochloride with the equivalent of triethylamine, there was clear evidence of DL-material, and racemisation was considerable, whether in the "anhydride" or "amide" procedure; the same was found with diethyl phosphorochloridite in the "anhydride" procedure. When free glycine ethyl ester was used, DL-material was again detected in the product of both "anhydride" procedures, but no crystalline DL-rich fraction was isolated from the "amide" procedure with diethyl phosphorochloridite, although the specific rotations of the fractions are low; here we must await further experiments. It will be recalled that Anderson and his colleagues found evidence for the effect of chloride on racemisation during coupling, and therefore we condensed acetyl-L-leucine with free glycine ethyl ester in diethyl phosphite by the tetraethyl pyrophosphite "amide" procedure in the presence of added glycine ethyl ester hydrochloride, but we found no increase in the degree of racemisation. The beneficial effect of using free ester is most marked, in our experiments, in the diethyl phosphorochloridite "anhydride" procedure, and it may be significant that here the solvent is toluene, in which both glycine ethyl ester hydrochloride and triethylamine hydrochloride are only sparingly soluble. The liberation of the free ester from a suspension of the hydrochloride in toluene by means of triethylamine may therefore be incomplete, and any unreacted triethylamine will be expected to encourage racemisation during the subsequent coupling reaction. The difficulty here is that those solvents which are sufficiently polar to dissolve amino-ester hydrochlorides are often undesirable solvents for the coupling, since their high dielectric constant will promote racemisation, and we ourselves prefer to liberate the free ester first in a solvent which ensures complete reaction, and then to take up the ester in the chosen reaction medium.

Our investigations are still incomplete, and there are many points requiring

### Racemisation

further study. But I think we must conclude that the danger of some racemisation during coupling by many of the present methods is a very real one, even when "amino-activation" is involved, and I would add a plea that every proposed method of coupling should be examined in reactions which permit azlactone formation, and where racemic product can be surely detected.

### References

1. Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* **34**, 874 (1951).
2. Vaughan J. R. Jr.: *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3547 (1951).
3. Wieland T., Bernhard H.: *Ann.* **572**, 190 (1951).
4. Vaughan J. R. Jr.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 6137 (1952).
5. Vaughan J. R. Jr., Eichler J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5556 (1953).
6. Anderson G. W., Young R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5307 (1952).
7. Anderson G. W., Blodinger M., Welcher A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5309 (1952).
8. Young R. W., Wood K. H., Joyce J. R., Anderson G. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2126 (1956).
9. Anderson G. W., Callahan F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2902 (1958).
10. Kenner G. W., Stedman R. J.: *J. Chem. Soc.* **1952**, 2069.
11. Clayton D. W., Farrington J. A., Kenner G. W., Turner J. M.: *J. Chem. Soc.* **1957**, 1398.
12. Farrington J. A., Hextall P. J., Kenner G. W., Turner J. M.: *J. Chem. Soc.* **1957**, 1407.
13. Sheehan J. C., Hess G. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).
14. Sheehan J. C., Yang D.-D. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1154 (1958).
15. e. g. Goldschmidt S., Lautenschlager H.: *Ann.* **580**, 68 (1953); Goldschmidt S., Jutz C.: *Chem. Ber.* **86**, 1116 (1953).
16. Grassmann W., Wunsch E., Riedel A.: *Chem. Ber.* **91**, 455 (1958).
17. Arens J. F.: *Rec. trav. chim.* **74**, 769 (1955); Heslinga L., Arens J. F.: *Rec. trav. chim.* **76**, 982 (1957).
18. DeWitt H. D., Ingersoll A. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3359 (1951).
19. North M. B., Young G. T.: *Chem. & Ind. (London)* **1955**, 1597; North M. B., Smart N. A., Young G. T.: *Abstracts Proc. 19th Internat. Congr. Pure and Appl. Chem., Paris, 1957*. Vol. II, p. 238.
20. Hofmann K., Woolner M. E., Spühler G., Schwartz E. T.: *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1486 (1958).
21. Anderson G. W., Paul R.: *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4423 (1958).

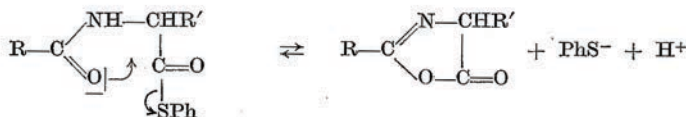
## Discussion

on the paper presented by G. T. YOUNG

BRENNER: I wonder whether Dr Young could give any comments on what he thinks might be the reasons for these racemisations. The customary way of looking at the problem is to say azlactones are formed as intermediates. But I hardly think that can be the real reason. It is true that whenever you can formulate an azlactone then racemisation is likely to occur, but the racemisation happens so fast that I hardly can imagine that azlactones are really formed and opened, formed and opened all the time. What is your opinion on that question?

YOUNG: Well, I have always felt that the most important route to racemisation is probably through azlactones. The evidence is pretty strong — whenever you can get racemisation I think that you can always get an azlactone. Benzyloxycarbonyl amino-acids do not form azlactones and are not subject to racemisation. Furthermore, if you suggest that racemisation is due to the lability of the  $\alpha$  hydrogen, it is difficult to explain why phthalylamino-acid chlorides or tosyl-amino-acid chlorides do not racemise. The formation of an azlactone seems to fit in so many cases that I still suppose that it is the main mechanism.

WIELAND: Wenn man einen aktivierten Phenylester, z. B. *p*-Nitrophenylester, zur Peptidsynthese verwendet, so ist von Kenner gezeigt worden, daß auch bei der Kupplung dieser Verbindung mit dem Ester einer zweiten Aminosäure Racemisierung eintritt. Die Thioverbindungen ohne die Nitrogruppe sind von uns ziemlich eingehend untersucht worden und bisher stand hierbei noch jegliche Untersuchung über die Racemisierung aus. Ich habe schon heute morgen erwähnt, daß die Aktivierung durch den Thiophenylrest bei Dipeptiden nicht so „energisch“ ist, um das Wort einmal zu gebrauchen, wie wenn man hier eine der anderen Anhydridmethoden anwendet — daß die Kupplung mit dem Ester einer Aminosäure höhere Temperaturen erfordert. Der Vorteil, auf den ich heute morgen auch schon hingewiesen habe, besteht darin, daß man im wässrigen Medium arbeiten kann. Man muß also, um eine solche Verbindung mit einem Aminosäureester zu kuppeln, bei 60° in Wasser-Alkohol einige Zeit — ein bis zwei Stunden — erwärmen. Das sind an sich Bedingungen, die der Racemisierung sehr stark Vorschub leisten würden: Polares Medium begünstigt die Ausbildung des Azlactonringes, usw.. Basische Bedingungen sind auch vorhanden, weil der Aminosäureester im Überschuß vorhanden ist, oder zumindest noch nicht gebunden ist, so daß er noch basisch ist. Und trotzdem zeigt die Aufarbeitung eines solchen Ansatzes, daß nur höchstens 5% Racemisierung dabei auftritt. Zur Erklärung dieses Verhaltens kann man sich vielleicht folgendes zurechtlegen: Der Kohlenstoff ist von Wasser (nucleophiler Sauerstoff) schwer angreifbar, wenn er mit Schwefel verbunden ist. Deshalb sind ja die Thioacylverbindungen gegen Hydrolyse und sogar gegen OH<sup>-</sup>-Ionen relativ stabil. Wenn nun ein Azlacton intermediär auftreten soll, dann muß der Sauerstoff der eigenen Molekel am Carbonyl-Kohlenstoff angreifen:



Da der Kohlenstoff durch den benachbarten Schwefel gerade vor dem Sauerstoffangriff geschützt zu sein scheint, wäre es eine Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben der Racemisierung, daß bei einer solchen Verbindung der Angriff des Sauerstoffs auf den Kohlenstoff nur in ganz untergeordnetem Masse stattfindet. Wir haben soeben von Herrn Young gehört, daß es fast keine Methode gibt, die gegen Racemisierung narrensicher ist, so daß diejenigen, bei denen auch unter den drastischen Bedingungen keine Racemisierung eintritt, vielleicht in der Zukunft umso begehrenswerter sein werden.

RUSSELL: Dr D. F. Elliott and I have looked a little into the question of racemisation with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. While our studies are not nearly so rigorous as those of Dr Young, we feel they may be of practical interest.

## Racemisation

A sample of L- $\alpha$ -aspartyl-L-arginine prepared by the carbodiimide-*p*-nitrophenol method [Elliott D. F., Russell D. W.: *Biochem. J.*, **66**, 49 p (1957)] was hydrolyzed with 6N-HCl at 110°. The aspartic acid isolated by ion-exchange chromatography (93%) was 6.7% racemized. However, under these conditions of acid hydrolysis L-aspartic acid is itself racemized to the extent of 4% [Camien M. N., Dunn M. S.: *Science* **124**, 1206 (1956)]; the corrected degree of racemization is therefore less than 3%.

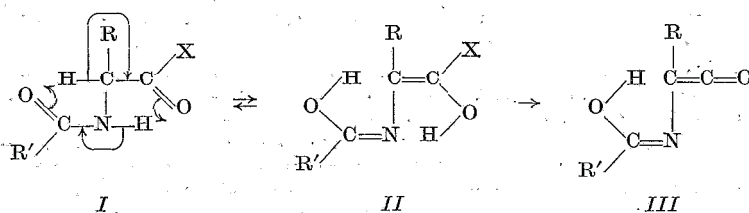
Our second example is L-prolyl-L-phenylalanine. This dipeptide has been prepared from natural sources [Osborne T. B., Clapp S. H.: *Am. J. Physiol.* **18**, 123 (1907)] and also synthesized by two different routes [Fischer E., Luniak A.: *Ber.* **42**, 4752 (1909); Bergmann M., Tietzman J. E.: *J. Biol. Chem.* **155**, 535 (1944)]. We prepared benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-phenylalanine methyl ester using the carbodiimide method. The solvent was methylene dichloride. The crude ester was converted to the free peptide by two routes differing in the order of removal of the protecting groups. The specific rotations were  $-39.8 \pm 0.9^\circ$  and  $41.1 \pm 0.9^\circ$ , calculated for anhydrous dipeptide. These agree well with published values, viz:  $-40.9^\circ$ ,  $-41.6^\circ$  (Osborne and Clapp),  $-40.9^\circ$  (Fischer and Luniak),  $-40.8^\circ$  (Bergmann and Tietzman). Some of these values are ambiguous, as they may refer to the monohydrate, but the figure given by Fischer and Luniak clearly applies to anhydrous dipeptide.

We have also prepared O-acetyl-N-benzyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-valine methyl ester by carbodiimide condensation. The reaction was done in anhydrous ethylene dichloride and in tetrahydrofuran containing 15% of water. No difference in specific rotation or melting point was found between samples prepared in the two solvents.

In these examples, at least one crystallisation was performed *en route*. The figures given cannot therefore reflect accurately the amount of racemization produced by using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. They suggest, however, that in practice the method can give products with a high degree of optical purity.

RUDINGER: The prolyl dipeptide is, of course, not a fair example from the point of view of racemisation because again, if we accept the azlactone mechanism of racemisation, proline (and glycine) are immune to that. In fact, as a lot of people are no doubt aware, in designing the tactics of synthesis of large peptides it is always a relief if you can form bonds between large peptide fragments at a glycyI or prolyl position. Unfortunately, there are often other considerations which don't make this the overruling one.

BRENNER: May I, just to make the discussion last a little longer, offer up a tentative mechanism of racemisation which does not involve an azlactone intermediate? Ich habe versucht, mir einen anderen Mechanismus der Racemisierung vorzustellen, der auch nicht abläuft, wenn man Carbo-benzyoxyaminosäuren hat, und auch nicht bei Prolin-Derivaten. Formel I ist z. B. das gemischte Anhydrid einer acylierten Aminosäure mit einer Carbonsäure wenn wir  $X = R.COO$  schreiben. Nun ist es leicht denkbar, daß im Sinne der Pfeile in I eine Tautomerisierung nach II eintritt; wenn sie zurückgeht, dann ist das Produkt racemisiert.



Voraussetzung für das Spielen eines derartigen Mechanismus ist a) ein Wasserstoffatom am Amid-Stickstoff der Acylaminosäure (Ausschluß von Phthaloylaminosäuren und von Prolin) und b) ein Acylrest mit einer Carbonyl-doppelbindung, die sich leicht aufrichten kann (Ausschluß von Alkyloxycarbonyl- und Tosyl-aminosäuren). Zunehmende Elektronaffinität von X dürfte die Bildung von II begünstigen, ganz ähnlich, wie sie den Angriff einer Base auf das Carbonylkohlenstoffatom einer aktivierten Carboxylgruppe begünstigt. Das Tautomere II kann nach I zurückgehen oder eventuell ein Keten III bilden und bei Peptidsynthesen als solches weiter reagieren.

Now I hope you will have an argument against that!

Of course, the azlactone hypothesis offers the advantage that azlactones are known; you can prepare them. The disadvantage, however, lies in the fact that they are too stable. They do not

## Discussion

hydrolyse as quickly as you would expect them to do if they were intermediates in racemisation. Take the case of an acetylamino-acid in acetic acid-water: Add acetic anhydride, and you at once have racemisation. These are conditions under which you would never expect fast hydrolysis of an azlactone. I believe we have been induced by our formulae to think that it just had to be azlactones because everything fitted in with this hypothesis.

YOUNG: I think it would be very interesting to devise an experiment to test that.

WIELAND: Es ist bekannt, daß das  $\alpha$ -Wasserstoffatom in Derivaten der Säuren abgespalten werden kann. Wir können ja sogar aus Acetylchlorid und Pyridin Dehydracetsäure erhalten, die gleiche Kondensation, die Claisen mit Essigester macht, wobei auch die Dissoziation eines  $\alpha$ -ständigen Protons der erste Schritt ist.

BRENNER: Ja, auch die Dakinsche Aminoketon-Synthese geht auf diese Weise, nicht wahr.

WIELAND: Also wollen wir noch einmal festhalten — wenn die Carboxylgruppe aktiviert ist, dann ist das  $\alpha$ -Wasserstoffatom labilisiert. Das ist eine allgemeine Regel — die Reaktion der aktiven Essigsäure ist ja auch so etwas ähnliches, oder die Perkinsche Kondensation, und all diese Kondensationen beruhen auf diesem Prinzip. Es wäre dann nur zu fragen, warum es von der Natur des am Stickstoff haftenden Substituenten abhängt, ob einmal Racemisierung einsetzt und ein andermal nicht.

GOLDSCHMIDT: Kann man diese Fälle nicht vergleichen mit der Autoracemisierung von  $\alpha$ -Hydroxyfettsäureestern oder auch von  $\alpha$ -Aminofettsäureestern, die von P. Walden beschrieben worden ist? Er hat ja gefunden, daß bei aktiven Hydroxyfettsäureestern nach längerer Zeit — bis zu Jahren — allmählich eine vollkommene Racemisierung eintritt, die speziell durch polare Lösungsmittel beschleunigt wird.

WIELAND: Ist dabei nicht auch noch die Luft beteiligt?

GOLDSCHMIDT: Ich glaube kaum. Die Ester wurden in geschlossenen Flaschen bewahrt. Ich nehme an, Walden hat die Substanzen einfach dargestellt und ihre optische Aktivität in längeren Zeitabschnitten kontrolliert.

WIELAND: Bei Alkoholen oder Ketonen ist bekannt, daß Racemisierung einsetzt, wenn eine Spur Keton neben dem sekundären Alkohol vorhanden ist, weil eine Wasserstoffwanderung hin und her stattfinden kann.

GOLDSCHMIDT: Das tritt unter der Einwirkung von Natriumhydroxyd ein.

WIELAND: Glas ist ja alkalisch. Vielleicht ist Luft und Alkali auch hier der Grund, zumal die Reaktion Jahre dauert, wie Sie gerade sagten.

GOLDSCHMIDT: Wenn ich mir selbst noch eine kurze Bemerkung erlauben darf: Wir haben bei der Phosphorazomethode nur einen einzigen Fall gefunden, bei dem Racemisierung eintrat, und das war dort, wo wir eine andere Schutzgruppe gewählt haben. Wir haben Glutaminsäurepeptide hergestellt und dabei einmal als Schutzgruppe den Phenylacetylrest genommen, den Süs in seinen Untersuchungen vielfach gebraucht hat; dabei haben wir weitgehende Racemisierung festgestellt, aber nicht, wenn wir anstatt des genannten Restes den Carbobenzoylrest eingeführt hatten.

BRENNER: Wir haben vor einiger Zeit Salicylpeptide aufgebaut und haben dazu auch Ihre Phosphorazomethode benützt. Aus Gründen, die ich weiter nicht kenne, ist der Salicylrest auch einer der Reste, die Racemisierung außerordentlich begünstigen, viel mehr noch als Acetyl und als Benzoyl. Nun geht eigenartigerweise diese Begünstigung so weit, daß man Racemisierung auch in Resten bekommt, die von dem Salicylrest entfernt sind. Wenn man also z. B. Salicyl-glycyl-L-phenylalanin nach irgendeiner der modernen Methoden mit einem Glycinester kuppelt, dann findet man immer Racemisierung, es sei denn, man nähme die Schwyzersche Methode mit den aktivierten Estern. Umgekehrt, wenn man Salicyl-L-phenylalanyl-glycin nimmt und kuppelt, so wird das L-Phenylalanin racemisiert, obschon es durch das Glycin eigentlich geschützt ist. Die Carboxygruppe des Phenylalanins ist hier an der Aktivierung nicht beteiligt, und gleichwohl findet sehr leicht Racemisierung statt. Wir kommen so zu der Annahme, daß die *ortho*-ständige Hydroxylgruppe in der Salicylsäure an dem Racemisierungsvorgang irgendwie beteiligt ist. Die Azlactonhypothese gibt keine Erklärung.

GOLDSCHMIDT: Es ist mir bei den Versuchen von Anderson etwas aufgefallen, das eigentlich nicht recht zu verstehen ist. Er hat eine Anzahl von Versuchen nach der sogenannten Standardmethode ausgeführt und zwar mit freier Aminogruppe und acylierter Aminosäure unter Anwendung von Äthylphosphitchlorid in Gegenwart von Triäthylamin mit Diäthylphosphit als Lösungsmittel. Die Ausbeuten an Racemat wechseln trotzdem außerordentlich stark, von 5% bis 18% DL-Verbindung — ohne daß man sieht, woher das eigentlich kommt.

## Racemisation

YOUNG: I think these experiments used the ester hydrochloride with triethylamine, and my only suggestion would be that under those conditions, if you get incomplete liberation of free ester, you may then get varying amounts of triethylamine remaining during the coupling. You don't get complete solution when you add the ester hydrochloride and triethylamine to diethyl phosphite; it is a heterogeneous reaction — if it is not complete, then you get unchanged triethylamine. If that is so then I think you would expect a variation in racemisation.

RUDINGER: There is to my mind one point which has appeared indirectly from what Dr Young has said, and that is the fact we are very badly off for detecting partial racemisation in syntheses that are not model syntheses. We can pick systems where we can find it quite easily, but we have great difficulty in telling when we have made, say, an octapeptide of some kind whether or no there has been racemisation. Procedures involving hydrolysis to the amino-acids are always suspect because a certain amount of racemisation attends acid hydrolysis; and that amount cannot be easily corrected for by model experiments because the extent of racemisation may depend on the way in which the amino-acid is bound in the peptide chain. There is another method which has been used, and that is to prepare the same peptide by several procedures and if the rotations agree fairly well then you conclude that you have got the optically pure product. That seems quite legitimate; but the method is rather laborious, involving, as it does, several syntheses. I wonder whether anyone here has had any experience with a method which has been lately used by Hofmann and his group at Pittsburgh who check the optical purity at the individual peptide bonds by enzymic hydrolysis. From their results it looks a promising method. However, among their results there is one case [J. Am. Chem. Soc. 80, 1486 (1958)] where a peptide bond was formed between arginine and tryptophan and the optical purity of the product tested with trypsin. With the crude peptide they had very little fission — about 37%. Well, even if racemisation were complete you would expect at least 50% fission, unless there was asymmetric induction right over in favour of the D-form, and that does not seem very likely. Perhaps we should go into consultation with the enzyme chemists on this matter and find out what we can expect from these enzymes and what we must not expect from them — for instance, on questions of competitive inhibition, etc.

ŠORM: I think it would be much better to hydrolyse these peptides completely and to check the racemisation by D-amino-oxidase. It would be a very convenient method. I also think that it would be more effective if the peptide chemists purified their products more during the synthesis; it should be possible to elaborate some methods by which it is possible to purify from racemised material. We have such methods in protein work.

RUDINGER: The use of D-amino-acid oxidase in this way again involves the uncertainties in hydrolysis. In particular Syngé has shown for valine peptides — it was during his work on gramicidin [Biochem. J. 44, 542 (1949)] — that the extent of racemisation on acid hydrolysis even depends on the exact conditions of hydrolysis. That is why I thought that any method involving hydrolysis right down to the amino-acids was not quite safe.

As regards the question of separation, I think Prof. Šorm has in mind some work by Mr Pravda in our Laboratories: We required some D-phenylalanyl-L-leucine, and he found that carbobenzoxy-DL-phenylalanine when coupled with L-leucine methyl ester gave a mixture of diastereomeric peptides which could be separated by crystallisation, to give quite pure carbobenzoxy-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester. There are a few cases like that reported in the literature [e. g. Polglase W. J., Smith E. L.: J. Am. Chem. Soc. 71, 3081 (1949); Hinman J. W., Caron E. L., Christensen H. N.: J. Am. Chem. Soc. 72, 1620 (1950)]. Recently Schnabel and Zahn [Ann. 614, 141 (1958)] have reported another case. When Mr. Pravda hydrolysed the material from the mother liquors, he could by crystallisation of the acids get some pure L-L isomer, though it is rather difficult and the yields are rather poor. Now recently at Prof. Šorm's suggestion we have subjected the esters from the mother liquors to column chromatography on alumina. It is an ideal case for that, because you have the carbobenzoxy group, the benzyl side chain, and the leucine — all very "fatty" — and there is only one peptide bond in the middle. In the first trial run there was in fact practically perfect separation of the two diastereomers. But I think that the trouble with these separation procedures is that as the size of the peptides is increased, the parts of them which are the same become larger, and the parts which differ become smaller and smaller so that the separation procedures which will be required for large peptides will be laborious and lengthy; most of those which are available are suitable only for free peptides, or at least derivatives only protected at one end. Though I do accept the criticism that we make insufficient use of efficient separation techniques, I still think it would be useful to have procedures for avoiding racemisation and also for detecting racemisation in these actual syntheses with a definite aim.

YOUNG: Mr Rudinger has made a point which I would have liked to make, that my object in this work, in trying to detect small amounts of racemisation, has been rather to think of the

situation in the syntheses which are now being carried out, amounting to a very large number of residues, in which in the late stages even a minute amount of racemised material can be extremely troublesome. I think that it is very important that we should try to get a method of determining the optical purity of peptides of some eight to twenty units. I am wondering whether the method we used in estimating the optical purity of glutamic acid isolated by isotope-dilution analysis [Hughes J. W., Williams E. W., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* 1951, 1279; Williams E. W., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* 1951, 1745], might be made available on a small enough scale. It depended on the solubility criterion. We had two solutions, one saturated with the minimum amount of solid, and the other saturated with a large excess of solid and we either compared the vapour pressure of those two solutions or else found the difference in refractive index. At the time we had quite a lot of material to use, and so we only used it on a relatively large scale — 100 mg or so of material — but I think it could be adapted to a smaller scale and certainly it detected less than 1% of D-glutamic acid in L-glutamic acid hydrochloride.

RYCHLÍK: Vielleicht wäre es auch möglich, die Spezifität der Proteasen und Peptidasen zur Lösung dieses Problems auszunützen. Man könnte z. B. so ein Peptid mit einer Mischung von Chymotrypsin und Trypsin zu kleineren Spaltstücken abbauen und diese dann mit Carboxypeptidase oder Leucinaminopeptidase spalten. Wenn das Enzym auf einer D-Aminosäure stößt, dann hört der Abbau auf. Es wäre dann möglich, aus den Resten, die nicht zu freien Aminosäuren abgebaut sind, auf Racemisierung zu schließen.

ŠORM: Das wäre auch eine Möglichkeit — eine Totalhydrolyse, wie Dr. Rychlík sagte, mit verschiedenen Enzymen durchzuführen und dann die Trennungsmethoden anzuwenden — die Produkte chromatographisch zu trennen und die Peptide zu finden.

RYCHLÍK: Wenn das enzymische Hydrolysat nur Aminosäuren enthält, heißt das, daß sie alle die L-Konfiguration hatten; wenn noch Peptide bleiben, dann heißt das sehr wahrscheinlich, daß es an diesem Punkt zur Racemisierung gekommen ist. Diese Methode könnte auch den Punkt finden, wo die größte Racemisierung vorkommt.

WIELAND: Hier ist einzuwenden, daß Fälle bekannt sind, wo in einem Oligopeptid, das nur eine D-Aminosäure hat, auch die danebenliegenden Peptidbindungen enzymatisch nicht mehr angegriffen werden: da würde diese Methode natürlich versagen. Wenn Sie ein Tetrapeptid mit einer D-Aminosäure haben, die in der Mitte liegt, dann wird die End-aminosäure von der Carboxypeptidase unter Umständen nicht mehr angegriffen.

RYCHLÍK: Man findet aber so doch Racemisierung. Die Frage von D-Aminosäuren, die in einem L-Aminosäurepeptid eingebaut sind, ist eine verhältnismäßig neue Frage; aber ich glaube, daß hier mit Hilfe von Enzymen auch größere Peptide zu analysieren wären.

WIELAND: Wir haben z. B. durch Öffnung des Ringes bei dem Phalloidin ein offenes Peptid erhalten, aus dem wir auch noch den Schwefel entfernen können, so daß es einfach ein Heptapeptid ist, in dem eine D-Aminosäure enthalten ist; dieses Heptapeptid wird durch kein Enzym gespalten. Da können Sie also nicht sagen, welches die D-Aminosäure ist.

ŠORM: Man müßte da wieder von diesem Peptid eine chemische Totalhydrolyse machen — die Bedingungen sind ja bekannt — und dann mit D-Aminoxydase die D-Aminosäure bestimmen. Das ist eine ziemlich schwierige Arbeit, aber ich glaube, es ist eines der schwierigsten Probleme der Peptidsynthese.

BRENNER: Ich habe mich in Wien mit K. Hofmann über die Leucinaminopeptidasenspaltung unterhalten. Die Sache ist ganz einfach, wenn das Peptid einmal gereinigt ist. Man kann dann die Methode gebrauchen, um zu beweisen, daß ein Peptid wirklich nur aus L-Aminosäuren besteht. Sobald man aber das Ferment benützt, solange noch eine Mischung vorliegt, sind viele Unsicherheitsfaktoren vorhanden.

SCHEMJAKIN: Vielleicht kann man noch einen Weg zur Synthese optisch aktiver Peptide verwenden. Wie schon vor langer Zeit Greenstein zeigte, kann Acylase Acyl-L-aminosäuren zu Aminosäuren verseifen. Im vorigen Jahre haben in unserem Institut Schtschukina und Spiritschew entdeckt, daß Acylase auch verschiedene Aminosäuren mit Carbonsäuren acylieren kann, wenn diese Carbonsäuren nicht zu starke Säuren sind [Spiritschew V. B., Schtschukina L. A.: *Ž. obšč. chim.* 28, 1709 (1956); Spiritschew V. B., Tschu T.-W., Orechowsch V. N., Schtschukina L. A.: *Biochimia* 23, 895 (1958)]. Diese acylierenden Eigenschaften der Acylase wurden zum Grunde einer Methode der Synthese von Acyl-L-aminosäuren unmittelbar aus racemischen Aminosäuren gelegt. Wie unsere ersten Resultate zeigen, kann man wahrscheinlich die acylierenden und desacylierenden Eigenschaften der Acylase auch zur Darstellung von einigen optisch aktiven Peptiden aus den racemischen Peptiden verwenden, in welchen die aminoendständige Aminosäure racemisch ist. Diese Arbeit ist eben nur angefangen, doch kann man denken, daß diese Methode wenigstens in einigen Fällen zu positiven Resultaten führen kann —

### *Racemisation*

nämlich dann, wenn der Acylrest leicht abspaltbar ist, aber die Peptidbindung mit Acylase nicht leicht spaltbar sind. Diese Arbeit ist erst am Anfang und ich weiß noch nicht, ob es im weiteren gelingen wird, in dieser Richtung eine Methode zu bilden, doch die ersten Resultate zeigen, daß man hier etwas suchen kann.

BRENNER: Der Nachteil dieser Verfahren liegt aber darin, daß man immer das machen muß, was die Fermente wollen, und nicht das machen kann, was man selber möchte.

SCHMJKIN: Die Acylase kann solche Acylreste leicht abspalten, welche von starken Säuren abgeleitet sind. Umgekehrt acyliert sie am leichtesten mit schwachen Säuren. Die Peptidbindungen werden in verschiedenen Fällen verschieden von Acylase gespalten, und man kann so kombinieren, um in einigen Fällen befriedigende Resultate zu erhalten.

BRENNER: Können Sie mit Essigsäure acetylieren, und andererseits unter den gleichen Bedingungen ein Trichloracetylderivat spalten?

SCHMJKIN: Unter fast denselben Bedingungen. Wenn man acetyliert, soll man die Essigsäure in größerem Überschuß nehmen, und sehr viel Acylase verwenden; wenn man desacyliert, kann man weniger Acylase nehmen.

BRENNER: Welche Ausbeuten an Acetylverbindung bekommen Sie, bezogen auf die Aminosäure?

SCHMJKIN: Diese Arbeit sind erst am Anfang, und am Anfang sind die Resultate noch nicht sehr gut; aber ich glaube hier gibt es etwas zu suchen, da die Ausbeute in einigen Fällen 50% erreicht.

WIELAND: I would like to ask Dr Young if the racemising effect of an anhydride and so on is as pronounced if you use not the dipeptide of an L-amino-acid, but if residues of more L-amino-acids are attached to this. Is the danger of racemisation as great, or greater, if a longer peptide is used?

YOUNG: I don't think there is any experimental work to answer that. All I can think of is Kenner's experiments in which he examined his methods using both a benzyloxycarbonyl-dipeptide coupling with an amino-acid, and also benzyloxycarbonylglycyl-L-alanine with L-phenylalanyl-glycine, and he found, I think, in every instance much more racemisation in the second case, when he was making a tetrapeptide, than when he was making a tripeptide; but I suspect that the influence of the particular amino-acid may be just as important as the length of the chain.

WIELAND: Several octapeptides have been synthesised in a pure state, and I wonder how this is possible if the danger of racemisation is so great? I am thinking of oxytocin, gramicidin and so on.

YOUNG: I think all these syntheses involve quite extensive purification at several stages, often by countercurrent distribution. There of course you can remove diastereoisomers, and I think that that is why so much difficulty is encountered in these syntheses.

RUDINGER: This is just where our worry arises. We have been having discussions on the possibility of introducing synthetic oxytocin instead of pituitary powder as the International Standard; and it seemed to us that the main difficulty there was that while we may be sure we have a chemically homogeneous material, we can't be sure it is also stereochemically homogeneous. We did try to design our synthesis so as to use the azide method to join up peptide fragments; but there is one stage of which we cannot be quite sure. Of course it should not matter if there are two or three per cent of partially racemised material there, if it could be safely assumed that this material is inactive. But with the results we as well as other workers have had with the activity of analogues, we can never be quite sure that a diastereomer might not be either much more active, or an inhibitor, or that it might not have some marked physiological effect which would be very much more pronounced than we should expect from the very small amount of material present. Unless you accept du Vigneaud's comparison of the optical rotations of the pure natural and synthetic oxytocin — and the rotation measurements are not completely reliable if the rotation of the other isomers is not known — there is no real guarantee that these large peptides are optically pure. There is another instance in which Boissonnas and his group have joined together twenty amino-acids to make an ACTH fragment; and they finish up with the conclusion that this fragment is not very active, which might be either due to the fact that there are still four amino-acids missing, or that it is extensively racemised during synthesis. That seems a pity after all the work that has been invested into the synthesis.

Then there is the question of possible variations in the ease of racemisation with the length of the chain, which nobody seems to have considered very much. Further, we have always assumed that what takes place is racemisation at one site; but in principle, if in an asymmetric environment there is complete freedom at one point, a thermodynamic equilibrium mixture

Discussion

might be formed in which the more favoured configuration would predominate — theoretically complete inversion might even take place. There seems to be no evidence just how powerful asymmetric induction can be in peptide material. One would expect it not to be too marked in fairly short chains without any secondary structure, but it might be very marked in small-ring peptides.

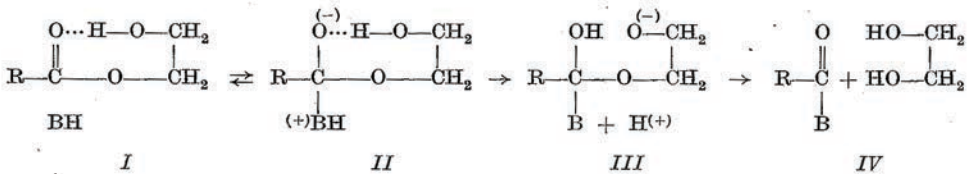
YOUNG: I would suggest that in such an important case as the establishment of an International Standard of oxytocin the solubility criterion should be considered. I think that could give a very clear answer.

BRENNER: Can it only be done with material which is crystalline and stable?

YOUNG: Yes.

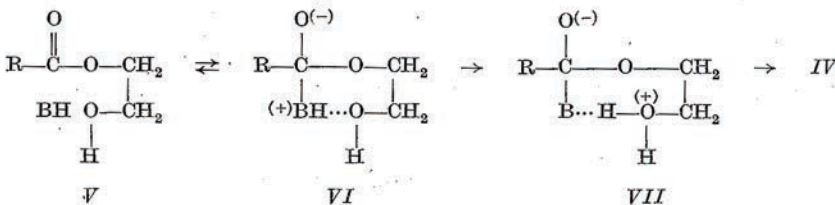
BRENNER: That is not the case with oxytocin, I am afraid! Ich möchte — von der Racemisierungsfrage ausgehend — auf einen Punkt zurückkommen, der hier heute morgen schon besprochen worden ist. Ich glaube wir müssen deshalb über Racemisierung reden, weil man bei der Entwicklung der Methoden der Peptidsynthese vielleicht einen grundsätzlich falschen Weg gegangen ist. Es ist doch so, daß man von den Alkylestern ausgegangen ist und daß man immer elektronaffinere Gruppen eingeführt hat um das Carboxyl zu aktivieren. Je stärker elektronenanziehend der aktivierende Rest, desto reaktionsfreudiger wird im allgemeinen die aktivierte Carboxylgruppe. Die Folge war nun aber die, daß die Racemisierungsgefahr zunahm. Nun, wir lernen aus der Biochemie, wir Herr Wieland heute morgen bemerkt hat, daß Mono-ester von 1,2-Glykolen offenbar aktiver sind als gewöhnliche Ester. Im Komplex aus Aminosäure und Ribonucleinsäure, welcher bei der biologischen Aminosäure-Aktivierung auftritt, ist die Aminosäure esterartig an ein Ribose-Hydroxyl gebunden [Zachau H. G., Aes G., Lipmann F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44, 885 (1958)]. Ich habe mich in diesem Zusammenhang an Beobachtungen erinnert, die wir vor vielen Jahren gemacht haben: Glykol- und Glycerinester von Methionin geben so rasch Diketopiperazin, daß wir es seinerzeit aufgegeben haben, damit zu arbeiten.

Die rasche Diketopiperazin-Bildung ist ein Hinweis auf eine ungewöhnlich große Aminolysegeschwindigkeit. Diese könnte im Sinne der nachstehenden Formulierungen auf einer Wirkung der benachbarten freien Hydroxylgruppe beruhen (BH stellt eine Base dar).



Das Gleichgewicht zwischen I und II wird durch die Beteiligung der benachbarten Hydroxylgruppe im Vergleich zur Aminolysereaktion bei einem gewöhnlichen Ester nach II verschoben; der Komplex II wird langlebiger und findet mehr Zeit, nach III zu deprotonisieren. Dieses zerfällt dann nach IV.

Die ebenfalls denkbare Variante V → VII → IV erscheint weniger wahrscheinlich, weil der Methioninester von Glykolmonomethyläther normale Beständigkeit aufweist [Brenner M., Pfister R. W.: Helv. Chim. Acta 33, 568 (1950)].



Die Beständigkeit des Glykolmonomethyläther-Esters scheint eine elektronische Aktivierung beim Glykolester auszuschließen. Damit dürfte hier auch die Racemisierungsgefahr gering sein. Es wäre interessant zu prüfen, ob sich dieses Prinzip präparativ auszunützen läßt. Die Hauptschwierigkeit liegt bei der Herstellung der Glykolester. Wir haben sie einerseits durch Umesterung

### Racemisation

von Methylestern in Gegenwart von Natriumalkoholat gemacht — das geht sehr gut, ist aber auch mit Racemisierung verbunden. Hingegen haben wir andere Umesterungen durchgeführt — aber nicht mit Glykol, das wäre noch zu probieren — mit Aluminium-isopropylat als Umesterungskatalysator. Dabei gibt es keine Racemisierung, weil das Aluminium-isopropylat im Gegensatz zum Natriumalkoholat ein saurer Katalysator ist.

WIELAND: Das habe ich mir natürlich bei der Vorbereitung meines Vortrags auch durch den Kopf gehen lassen — ich muß sagen, daß ich auf diese Erklärung der Aktivierung durch die Wasserstoffbrücke nicht gekommen bin. Es ist auch schwer nachzuprüfen, ob diese Theorie stimmt. Man muß immerhin den Glykolen doch zuschreiben, daß sie durch den Sauerstoff der zweiten Hydroxylgruppe auch elektronenabziehend wirken; und ich frage mich, ob das nicht schon genügen würde, um die Labilität zu erklären. Ich halte es auch für möglich, daß die Glykolester gute Ausgangsmaterialien für Peptidsynthesen wären. Und bei ihrer Synthese, habe ich mir überlegt, könnte man entweder einfach von Äthylenoxyd ausgehen, den Oxydring mit der Carbobenzoylaminosäure aufspalten, dann bekommt man ja Monoglykolester; das ist noch nicht versucht worden, soviel ich weiß — bei Aminosäuren, jedenfalls. Und die andere Möglichkeit wäre die, die Synthese, die wir benützt haben, um Aminosäureester des Adenosins zu machen, auf das Glykol zu übertragen: es werden einfach die Glykole, in unserem Fall das Adenosin, mit dem Hydrochlorid des Aminosäurethiophenylesters eine kurze Zeit auf etwa 80° erwärmt, wobei als Lösungsmittel Dimethylsulfoxyd sehr günstig ist, das sich ja in der letzten Zeit in der Peptidchemie ganz gut eingeführt hat. Was allerdings das optisch aktive Zentrum dazu sagt, das ist eine Frage, die man noch untersuchen müßte. Man kann leicht optisch aktive Thiophenylester machen; bei der Erhitzung und anschließend könnte natürlich bei der Umesterung die Racemisierung stattfinden, das müßte man ausprobieren. Sie haben Erfahrung mit diesen Verbindungen — sind sie kristallisiert?

BRENNER: Ich kenne nur die Methioninester. Sie sind flüssig, man kann sie im Hochvakuum destillieren, aber sie geben bereits während der Kondensation Diketopiperazin.

WIELAND: Bei der Destillation?

BRENNER: Ja, sie sind sehr empfindlich. Was meine Theorie anbetrifft, so möchte ich daran erinnern, daß man zum Beispiel manche Carbonsäureester in flüssigem Ammoniak sehr schwer amidieren kann, wenn man kein Methanol oder Glykol oder dergleichen zugibt. Es braucht eben Protonendonatoren, um die Ausbildung der Zwischenstufe zu erleichtern.

WIELAND: Und da genügt es, Alkohol zuzusetzen?

BRENNER: Ja. Ich glaube, daß die sterische Wirkung von einem Hydroxyl in richtiger Stellung — derart, daß der Sauerstoff sofort protoniert werden kann — in Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit außerordentlich groß ist.

WIELAND: Wir dürfen nicht vergessen: Sie sprechen von freien Estern, während wir es bei Peptidsynthesen doch meistens mit acylierten Aminosäureestern zu tun haben. Die acylierten Ester, also Carbobenzoylaminosäureglykolester, sollten viel leichter zugänglich sein als die freien.

## SYNTHESE OPTISCH AKTIVER PEPTIDE AUS RACEMISCHEN AMINOSÄUREESTERN

M. M. BOTWINIK\*

*Lomonossow-Staatsuniversität, Moskau*

Zur Synthese optisch aktiver Peptide gibt es drei Möglichkeiten. Man erhält sie aus optisch aktiven Aminosäuren, aus racemischen Aminosäuren mit anschließender Racematspaltung oder Trennung der Diastereomeren, und schließlich aus racemischen Aminosäuren durch asymmetrische Synthese mittels Fermenten.

Der erste Weg, der auch technische Bedeutung erlangt hat, braucht nicht kommentiert zu werden, verlangt aber als Ausgangsstoffe optisch aktive Aminosäuren. In vielen Fällen ist man jedoch gezwungen, die leichter zugänglichen racemischen Aminosäuren zu verwenden. Wenn man dabei den zweiten Weg benutzt, so erhält man Gemische von Stereoisomeren, die schwer zur Kristallisation zu bringen sind und deren Reinigung mit großen Schwierigkeiten und Verlusten verbunden ist. Dabei ist zu betonen, daß es ziemlich wenig Untersuchungen gibt, die den Methoden der Trennung der diastereomeren Peptide gewidmet sind. Die modernen Methoden zur Trennung von Aminosäure- und Peptidgemischen sind zu diesem Zwecke noch sehr wenig zur Verwendung gekommen.

Wir beschäftigen uns hier mit der dritten Art der Peptidsynthese — der stereospezifischen fermentativen Synthese, wobei nur ein Stereoisomer entsteht.

Diese Art der Peptidsynthese interessierte die Forscher hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Problem der Biosynthese natürlicher Eiweißstoffe. Bergmann, Fraenkel-Conrat und Fruton fanden als erste die Bedingungen, unter welchen die Peptidsynthese durch Papain, Bromelin und Chymotrypsin verwirklicht wird<sup>1</sup>. Diese Arbeiten waren glänzende Erfolge der Biochemie, eine präparative Methode der Peptidsynthese wurde aber dabei nicht geschaffen.

Im Jahre 1950 äußerte Brenner<sup>2</sup> die Vermutung, daß die Aminosäureester als energiereiche Zwischenverbindungen bei der Peptidsynthese dienen könnten. Er stützte sich dabei auf die Beobachtungen von Neurath über die Esterasewirkung des Chymotrypsins und auf die allbekannte Leichtigkeit, mit der Aminosäuren Kondensationen eingehen. Seine Vermutung bewies er durch Experimente. Unter Einwirkung des Chymotrypsins verwandelte sich der Isopropylester des DL-Methionins in ein Gemisch von Peptiden. Die letzteren wurden nicht nur chromatographisch identifiziert, sondern man faßte die Ester des L-Methionin-di- und -tripeptids auch in Substanz. Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch mit Threonin-isopropylester. Damit bewies Brenner als erster, daß die Aminosäureester unter der Wirkung von Chymotrypsin Peptide bilden, und stellte auch fest, daß die Reaktion stereospezifisch verläuft; es werden die L-Isomeren der Peptide gebildet.

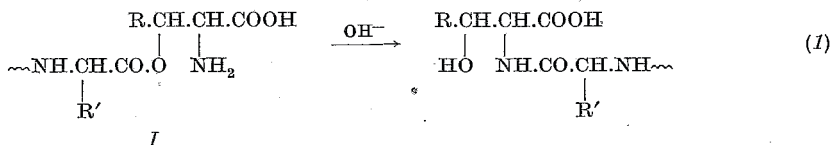
Die Fermentsynthese der Peptide wurde später von Tauber<sup>3</sup> studiert. In der Sowjetunion beschäftigen sich damit Kaganowa und Orechowitsch<sup>4</sup>, Lestro-

\* In Abwesenheit von Frau Prof. Botwinik vorgetragen von J. Rudinger.

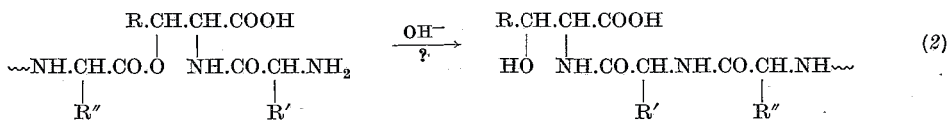
waja und Mardaschew<sup>5</sup>. Es wurde untersucht, welche Aminosäuren als Donoren und Acceptoren fungieren können und es wurden die optimalen Bedingungen der Reaktion ermittelt. Alle diese Untersuchungen hatten aber das Ziel, die Möglichkeit einer Beteiligung der Aminosäureester bei der Peptidsynthese *in vivo* aufzuklären.

Der Ausgangspunkt unserer Arbeiten über die Verwendung von Aminosäureestern zur Peptidsynthese war ein anderer. Wir sind seit einigen Jahren mit der Erforschung der sogenannten O-Peptide von  $\beta$ -Hydroxyaminosäuren (I) beschäftigt<sup>6</sup>. Es interessierten uns die Besonderheiten der Reaktionsfähigkeit der Esterbindung in diesen Verbindungen, insbesondere die schon von Bergmann erörterte Möglichkeit der Beteiligung von O-Peptiden in biologischen Vorgängen, bei der Spaltung und dem Aufbau von Peptiden. Unsere Versuche haben gezeigt, daß O-Peptide der  $\beta$ -Hydroxyaminosäuren für die Synthese verschiedener normaler Peptide verwendet werden können.

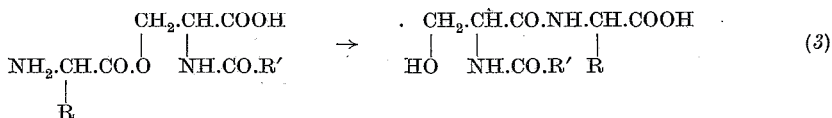
Wenn die Aminogruppe des Hydroxyaminosäure-Restes frei ist, so tritt in schwach basischem Medium eine Verschiebung des Aminoacylrestes vom Sauerstoff zum Stickstoff ein, und es entstehen nach (1) N-Peptide der Hydroxyaminosäuren. Wir erforschten diese Reaktion an Modellverbindungen<sup>7</sup>; von Desnuelle<sup>8</sup>, Elliott<sup>9</sup> und anderen Forschern<sup>10,11</sup> wurde sie an Eiweißstoffen studiert.



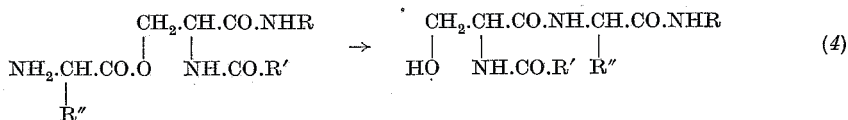
Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Aminoacylrest sich nicht nur zur benachbarten Aminogruppe verschieben kann, sondern auch fähig ist, zu einer entfernteren Aminogruppe zu wandern, [z. B. nach (2)] ähnlich wie es Wieland<sup>12</sup> bei Thio-amino-Verbindungen feststellte. Für Peptide der Hydroxyaminosäuren ist jedoch diese Reaktion bisher nicht bekannt.



Wenn die Aminogruppe im Hydroxyaminosäurerest substituiert ist, so kann der Aminoacylrest auch zur Carboxylgruppe wandern (3), wobei eine neue Peptidbindung entsteht<sup>13</sup>.

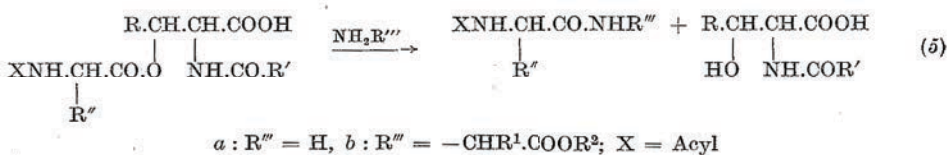


Der Aminoacylrest wandert auch in dem Falle, wenn die Verbindung anstatt des Carboxyls eine Amid- oder Peptid-Gruppierung enthält. In diesem Falle schiebt sich der Aminoacylrest in die CO-NH-Bindung ein (4). Diese äußerst interessante Reaktion wurde vor kurzem von Prof. Brenner entdeckt und ist in seinem Referat eingehend behandelt.



Sind schließlich beide Aminogruppen im O-Peptid substituiert, so entsteht, wie es uns festzustellen gelang, unter der Wirkung von Ammoniak nach (5a) das Amid der Acylaminosäure<sup>14</sup>. Die Spaltung verläuft fast momentan und mit quantitativer Ausbeute.

Wenn man in der letztgenannten Umsetzung das Ammoniak durch einen Aminosäureester ersetzt, so entstehen Ester neuer Peptide (5b). In diesem Falle verläuft die Reaktion nur sehr langsam, bei erhöhter Temperatur und unter Druck. Wird aber die Umsetzung in Gegenwart von Chymotrypsin vorgenommen, so verläuft sie rasch und stereospezifisch: es entstehen die L-Antipoden der Peptide<sup>15,16</sup>. Die letzte Reaktion unterscheidet sich von den oben erwähnten, indem in diesem Falle die Peptidsynthese durch eine intermolekulare Reaktion erfolgt.



Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß Chymotrypsin die O-Peptide ziemlich leicht spaltet. Ebenso leicht verläuft in Gegenwart von Chymotrypsin auch die Umsetzung zwischen O-Peptiden des Serins, Threonins, oder *allo*Threonins und den Estern von Aminosäuren und Peptiden. Dabei werden neue Peptidester gebildet. So entstehen bei der Reaktion zwischen N-Benzoyl-O-(benzoyl-DL-phenylalanyl)-DL-serin, -DL-threonin und -DL-*allo*-threonin mit Aminosäureestern in der Gegenwart von Chymotrypsin nach 10–15 Minuten Benzoylphenylalanylpeptidester<sup>16</sup> (Tab. I).

Tabelle I

Peptide des Benzoyl-phenylalanins durch chymotrypsin-katalysierte Aminolyse von O-Peptiden

N-Benzoyl-O-DL-phenylalanyl-	Ausbeute (%) an Benzoyl-L-phenylalanin-peptid mit			
	Glycin-äthylester	DL-Phenylalanin-äthylester	DL-Leucyl-glycin-äthylester	Glycyl-glycin-äthylester
-serin	48	46	68	15
-threonin	27	41	—	20
- <i>allo</i> threonin	11,5	22	—	6

Die in der Tabelle angeführten Zahlen zeigen, daß die Peptidausbeute in gewissem Maße auch von der Natur des hydroxylhaltigen Restes abhängt.

Unabhängig davon, welches O-Peptid in der Reaktion verwendet wurde (Serin-, Threonin-, oder *allo*Threonin-O-Peptid), erhielten wir Benzoylphenylalaninpeptide mit konstantem Schmelzpunkt. Diese Tatsache berechtigte zur Annahme, daß bei der Reaktion ausschließlich das L-Antipode nicht nur des Donors, sondern auch des Acceptors beteiligt ist. Zur Prüfung waren neue Versuche notwendig.

Unsere Arbeit unterscheidet sich von den Versuchen anderer Forscher nicht nur dadurch, daß der hydroxyhaltige Rest bei uns eine  $\beta$ -Hydroxyaminosäure ist, sondern auch dadurch, daß die Aminogruppe in unseren Verbindungen substituiert ist. Darum erhielten wir nur Dipeptidderivate, die sich als unpolare Verbindungen leicht aus der Reaktionslösung ausscheiden.

Die erörterten Untersuchungen bildeten die Grundlage für eine Methode der Synthese von optisch aktiven Peptiden. Um eine präparativ brauchbare Methode zu schaffen, war es notwendig, einige Änderungen in der angeführten Methodik vorzunehmen. Die Benzoylgruppe in den Donorverbindungen mußte durch eine andere, leicht abspaltbare Schutzgruppe ersetzt werden (z. B. Carbobenzoxygruppe) und der hydroxyhaltige Rest — die  $\beta$ -Hydroxyaminosäure — durch eine leichter zugängliche Verbindung. Der Versuch, Aminosäure-äthylester anzuwenden, blieb erfolglos: der Benzoyl-phenylalanyl-äthylester reagierte mit dem Glycin-äthylester praktisch überhaupt nicht. Es scheint, daß für den Reaktionsablauf die Gegenwart einer freien Carboxylgruppe in der hydroxyhaltigen Verbindung notwendig ist. Jedenfalls, wenn wir Glykol- oder Milchsäureester des Benzoylphenylalanins und des Carbobenzoxyphenylalanins für die Reaktion verwendeten, verlief die Umsetzung [nach (6)] ebenso leicht, wie mit O-Peptiden der  $\beta$ -Hydroxyaminosäuren<sup>17</sup>. So erhielten wir bei der Umsetzung des Glykolesters des Carbobenzoxy-DL-phenylalanins ( $R = C_6H_5CH_2$ ,  $R' = C_7H_7O$ ) mit dem Glycin-äthylester ( $R'' = H$ ) den Äthylester des Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-glycins mit einer Ausbeute von 58% (berechnet auf das L-Antipode). Die Umsetzung verläuft äußerst leicht: bei pH 8 und etwa 25° fällt nach 15–30 min. der kristalline Niederschlag des neuen Peptids aus.



Als Acceptorverbindungen kamen auch andere Aminosäure- und Peptidester zur Verwendung (Tab. II). Zur Prüfung der Stereospezifität der Reaktion hinsichtlich des Acceptors führten wir die Umsetzung mit L- und DL-Aminosäuren als Acceptor durch; in beiden Fällen erhielten wir die gleichen optisch aktiven Peptide.

Die erhaltenen Carbobenzoxy-L-peptidester können selbst wieder in Acceptorverbindungen übergeführt werden. So haben wir bei dem Äthylester des Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-glycins durch Hydrierung die Carbobenzoxygruppe eliminiert und den erhaltenen L-Phenylalanyl-glycin-äthylester mit dem Glykolester des Carbobenzoxy-DL-phenylalanins zur Reaktion gebracht. Dabei erhielten wir den Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-glycin-äthylester.

Die optimalen Versuchsbedingungen für die Synthese sind pH 8 bis 8,5, 20–25°, ein Donor : Acceptor-Verhältnis von 1 : 5, und eine Fermentmenge von 1,5–2 mg auf 0,001 Mol des Donors. Als Ferment kommt nicht nur reines Chymotrypsin, sondern auch ein entsprechend hergestelltes Pankreas-Präparat zur Verwendung. Den Glykolsäureester des Carbobenzoxyphenylalanins erhält man nach der Methode der gemischten Anhydride: das Präparat war ein Öl und wurde analytisch identifiziert.

Der bei der Reaktion entstehende Äthylester des Carbobenzoxypeptids bildet meistens einen kristallinen Niederschlag, zur Reinigung genügt es, ein- bis zweimal aus einem geeigneten Lösungsmittel umzukristallisieren. In den Fällen, wo kein Niederschlag gebildet wird, kann man das Reaktionsprodukt mit Chloroform extrahieren: der Extrakt wird dann mit verdünnten Säure- und Laugelösungen reingewaschen.

Tabelle II

Chymotrypsin-katalysierte Peptidsynthesen mit Carbobenzoxy-phenylalanin-glykolsäureester

Produkt	Ausbeute	Smp., °C	$[\alpha]_D^{21}$ (Äthanol)
Cbz-L-Phe-GlyOEt	58	109	-25,78
Cbz-L-Phe-L-LeuOEt	32 <sup>a</sup>	114-115	-30,54
	34	114-115	-30,07
Cbz-L-Phe-L-Phe-GlyOEt	54 <sup>a</sup>	184,5	-25,62
	30	184,5	-26,05
Cbz-L-Phe-L-Leu-GlyOEt	48 <sup>a</sup>	154-155	-28,0
	57	154-155	-26,28
Cbz-L-Phe-Gly-Gly-OEt	21 <sup>b</sup>	196-197 <sup>b</sup>	+10,31 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Aus DL-Aminosäure- bzw. -peptidester; berechnet auf L-Komponente. <sup>b</sup> Als Amid charakterisiert.

In allen unseren Versuchen, von denen oben die Rede war, diente als Donor der Glykolsäureester des Carbobenzoxyphenylalanins. Vorversuche mit dem Glykolsäureester des Carbobenzoxyglycins und des Carbobenzoxyleucins zeigten, daß die Reaktion auch in diesem Falle eintrat.

Wir studieren zur Zeit die Grenzen der geschilderten Methode der Synthese optisch aktiver Peptide; wir versuchen nämlich, Ester polyfunktioneller Aminosäuren und komplexe Peptide als Acceptorverbindungen zu verwenden und auch verschiedene andere Aminosäuren als Donorverbindungen einzusetzen. Auch Versuche zur Feststellung der Kettenlänge von durch diese Methode erhaltenen Polypeptiden sind im Gange.

Milchsäure und Glykolsäure sind bekanntlich Zwischenprodukte des Stoffwechsels. Darum kann man vermuten, daß die von uns entdeckte Reaktion auch in biochemischer Richtung von Interesse sein kann.

## Literatur

1. Bergmann M., Behrens O. K.: J. Biol. Chem. 124, 7 (1938); Bergmann M., Fruton J. S.: J. Biol. Chem. 124, 321 (1938); Bergmann M., Fraenkel-Conrat H.: J. Biol. Chem. 119, 707 (1937); 124, 1 (1938).
2. Brenner M., Müller H. R., Pfister R. W.: Helv. Chim. Acta 33, 568 (1950); Brenner M., Sailer E., Rüfenacht K.: Helv. Chim. Acta 34, 2096 (1951).
3. Tauber H.: J. Am. Chem. Soc. 74, 847 (1952).
4. Kaganowa I. L., Orechowitsch V. N.: Dokl. Akad. nauk SSSR 95, 1259 (1954).
5. Lestrowaja N. N., Mardaschew S. R.: Voprosy med. chimiji 2, 294 (1956).
6. Botwinik M. M., Awajewa S. M.: Dokl. Akad. nauk SSSR 84, 951 (1952); Ž. obšč. chim. 26, 3066 (1956).
7. Botwinik M. M., Awajewa S. M., Mistrjukow E. A.: Dokl. Akad. nauk SSSR 82, 727 (1952); Ž. obšč. chim. 24, 2084 (1954).
8. Desnuelle P., Casal A.: Biochim. et Biophys. Acta 2, 64 (1949).

9. Elliot D. E.: *Biochem. J.* **50**, 542 (1952).
10. Josefsson L., Edman P.: *Biochim. et Biophys. Acta* **25**, 617 (1957).
11. Josefsson L.: *Arkiv Kemi* **12**, 183 (1958).
12. Wieland T., Bokelman E., Bauer L., Lang H. U., Lau H.: *Ann.* **583**, 129 (1953).
13. Brenner M., Zimmermann J. P., Wehrmüller J., Quitt P., Hartmann A., Schneider W., Beglinger U.: *Helv. Chim. Acta* **40**, 1497 (1957).
14. Botwinik M. M., Awajewa S. M., Konowalova M. I., Ostoslawskaja V. J.: *Ž. obšč. chim.* **27**, 1910 (1957).
15. Botwinik M. M., Awajewa S. M.: *Dokl. Akad. nauk SSSR* **112**, 1053 (1957); *Ž. obšč. chim.* **28**, 1534 (1958).
16. Botwinik M. M., Awajewa S. M., Kara-Murza S. M.: *Voprosy med. chimiji* **5**, 102 (1959).
17. Botwinik M. M., Ostoslawskaja V. I.: *Dokl. Akad. nauk SSSR* **123**, 285 (1958).

## AMINO-SCHUTZGRUPPEN

E. WÜNSCH

*Max-Planck-Institut für Erweiß- und Lederforschung, München*

In den beiden vorausgegangenen Referaten haben Prof. Th. Wieland und Prof. St. Goldschmidt über die Probleme und Methoden der Herstellung der „Amidbindung“ aus Carbonsäure und Aminoverbindung erschöpfend berichtet. Die Übertragung auf das Peptidgebiet bedingt jedoch gewisse Voraussetzungen, die darin liegen, daß die miteinander zu verknüpfenden Komponenten gleichzeitig Amino- und Carboxylgruppe im Molekül enthalten und somit als Zwitterionen vorliegen. Eine gelenkte „systematische“ nucleophile Addition erzwingt daher eine vollständige Ausschaltung der zweiten funktionellen Gruppe des Aminosäure-Moleküls, zum ersten um die Zwitterionenform aufzuheben und so die Carboxyl- bzw. die Aminogruppe der notwendigen Aktivierung zugänglich zu machen, zum zweiten um diese zweite Funktion jedweden Angriff zu entziehen, d. h. sie zu schützen. Es ist selbstverständlich, daß nur solche „Schutzgruppen“ für die Peptidsynthese brauchbar sind, die nach erfolgter Verknüpfung der Komponenten leicht und ohne Zerstörung oder Veränderung der hergestellten Bindung wieder entfernt werden können.

Für den Schutz der Amino-Gruppe stehen dem Peptidchemiker heute vier Möglichkeiten zur Verfügung:

A. Acylierung, die Mono- und Diacyl-, Monosulfonyl- und Monosulfonylmonoacyl-Verbindungen umfaßt,

B. Alkylierung, die sich in Monoalkyl-, Dialkyl- und Alkyliden-Derivaten erschöpft,

C. Alkyl-Acylierung, also Monoacyl(sulfonyl)-monoalkyl-Aminosäuren und

D. Ammonsalz-Bildung.

Über Fortschritte und Erfahrungen auf diesem Sektor soll im folgenden berichtet werden.

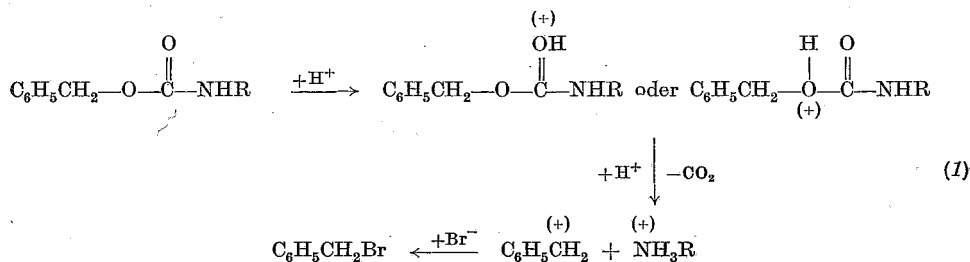
### A. Acylierung

#### Urethane

Das Scheitern E. Fischers<sup>1</sup> am Carbäthoxyrest hatte frühzeitig deutlich gemacht, daß nur solche N-Carbonsäureester als Amino-Schutzgruppe Verwendung finden können, die auf anderem Wege als durch alkalische Hydrolyse wieder abspaltbar sind. Diesen Anforderungen entsprach der 1932 von Bergmann und Zervas<sup>2</sup> eingeführte und bis heute alle anderen Schutzgruppen überragende *Carbobenzoxoy*-Rest, der mit katalytisch erregtem Wasserstoff (Pd-Katalysatoren) zweckmäßig in wäßrig-organischen Lösungsmitteln leicht wieder entfernt werden kann. Auch bei Methioninpeptiden führte dieses Verfahren zum Erfolg<sup>3</sup>. Der gleichzeitig empfohlene Zusatz von etwas Essigsäure ist jedoch nicht unbedingt erforderlich; im Falle der Synthese von Peptiden der Hydroxyaminosäuren im Hinblick auf eine mögliche N→O-Acylwanderung vielleicht sogar abzulehnen.

Die von du Vigneaud und Mitarbeitern<sup>4</sup> vorgeschlagene reduktive Spaltung der Carbobenzoxy-Verbindung mittels Natrium in flüssigem Ammoniak hat sich ebenfalls gut bewährt; bei genauer Dosierung und Zugabe der Natriummengen in sehr kleinen Portionen ist die Methode nach Hofmann<sup>5</sup> auch für Methionin-Derivate ohne Angriff auf die Methylthioäther-Gruppierung anwendbar.

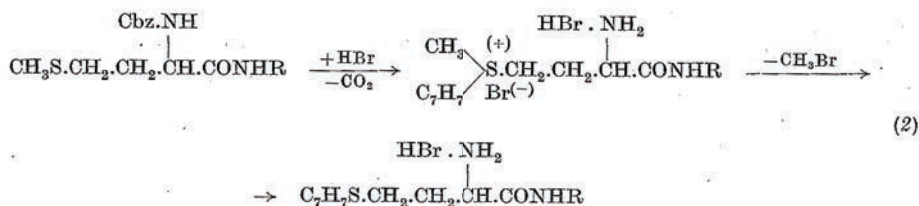
Einen sehr erheblichen Fortschritt brachte die Entacylierung mittels Halogenwasserstoffen in indifferenten Lösungsmitteln, der das Schema (I) einer durch Protonen katalysierten Solvolyse zugrundeliegt. So empfehlen Waldschmidt-Leitz und Kühn<sup>6</sup> Jodwasserstoff, Boissonnas und Preitner<sup>7</sup> Chlorwasserstoff, dieselben Autoren und Ben-Ishai<sup>8</sup> Bromwasserstoff jeweils in Eisessig. Wohl am gebräuchlichsten ist das letztere Verfahren; mit gesättigter Bromwasserstoff-Eisessiglösung ist die Decarbobenzoxylierung bei Raumtemperatur in 20–30 Minuten beendet. Zweckmäßig arbeitet man mit einem geringen Zusatz von Phenol (bei Thiophenylestern von Thiophenol) zum Abfangen von durch Luftoxydation freiwerdendem Brom. Die Entacylierung gelingt auch mit 1M-HBr in Eisessig über mehrere Stunden. Unter den geschilderten Bedingungen bleibt die Peptidbindung<sup>7</sup>, die primäre Carbonsäureamid-<sup>9</sup>, die Benzylthioäther-<sup>9</sup>, die  $\omega$ -Nitroguanido-<sup>10</sup>, die N(*Im*)-Benzyl-<sup>10</sup> und die Methyl-(Äthyl)-Estergruppierung praktisch unangegriffen; hingegen werden O-Benzyläther<sup>11</sup> und in nicht unerheblichen Maße entgegen den Feststellungen Ben-Ishais auch Benzylester gespalten<sup>12,13</sup>.



Bei Anwesenheit von Hydroxyaminosäuren muß bei dieser Entacylierungsmethodik mit O-Acetylierung gerechnet werden; vgl. dazu Okawa<sup>11</sup>. So erhielten wir bei der Spaltung von Carbobenzoxy-hydroxypropyl-glycinester mit 1M-HBr in Eisessig O-Acetyl-dipeptidester-hydrobromid. Zu unserer Überraschung blieb diese Sekundärreaktion bei der Einwirkung von gesättigter Bromwasserstoff-Eisessiglösung praktisch aus; wir konnten bei einer Reaktionszeit von 20 Minuten (Raumtemperatur) und folgender rascher Fällung mit Äther chromatographisch reines Hydroxypropylglycinester-Hydrobromid in ausgezeichneter Ausbeute isolieren<sup>14</sup>. Dennoch empfiehlt es sich, in Anwesenheit freier alkoholischer Hydroxylgruppen die Decarbobenzoxylierung nach Albertson und McKay<sup>15</sup> in Nitromethan oder nach Okawa<sup>11,15</sup> in Dioxan als Lösungsmittel auszuführen.

Beim Vorliegen von Methionin-Peptidderivaten versagt die Methode der Halogenwasserstoff-Solvolyse generell, da das bei der Benzylurethan-Spaltung freiwerdende Benzylhalogenid sich an die Thioäther-Gruppierung unter Bildung eines instabilen Sulfoniumsalzes anlagert. Dieses zerfällt nach (2) unter Abspaltung von Methylhalogenid zur S-Benzylhomocystein-Verbindung<sup>17</sup>

Neuerdings konnten Gawron und Draus<sup>18</sup> bei der Decarbobenzoxylierung von Carbobenzoxy-methionyl-glycin-äthylester mit Chlorwasserstoff in Alkohol sowohl das Homocystein-Derivat als auch das (in diesem Falle etwas stabilere) Sulfoniumsalz als Chloroplatinat isolieren.

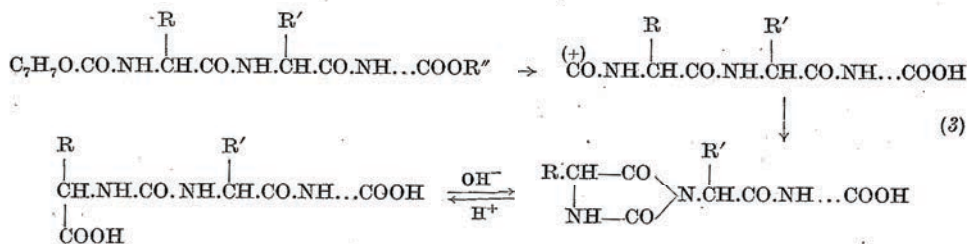


Ein weitgehendes Abfangen des Benzylhalogenids und damit der unerwünschten Nebenreaktion ist Boissonnas und Mitarbeitern<sup>19</sup> durch Zugabe von Benzyl-methyl-thioäther zum Reaktionsgemisch gelungen.

Die von White<sup>20</sup> vorgeschlagene Entacylierung der Carbobenzoxy-Verbindungen durch Erhitzen mit verdünnter Salzsäure auf 60° wurde neuerdings von Okawa<sup>16</sup> bei der Synthese eines Pentapeptids mit Erfolg herangezogen, die Reaktionstemperatur jedoch auf 36° gesenkt.

In letzter Zeit haben Taschner und Mitarbeiter<sup>21</sup> Toluolsulfonsäure in siedendem Toluol oder Benzol als Entacylierungsmittel vorgeschlagen. Unter wasserfreien Bedingungen ist die Reaktion (Entwicklung von CO<sub>2</sub>) in 5–25 Minuten beendet; die Peptidester fallen in Form der Sulfonate in hoher Ausbeute an. Ester- und gewisse andere Schutzgruppen bleiben nach den Autoren unangegriffen.

Als Nachteil des Carbobenzoxyrestes muß seine nicht vollkommene Alkali-beständigkeit unterstrichen werden. So entstehen bei der alkalischen Verseifung von Carbobenzoxy-peptidestern z. B. mit carboxylendständigem N<sup>c</sup>-Carbobenzoxy-lysin, Carbobenzoxy-valin oder -isoleucin auch unter „titrimetrischen“ Bedingungen (Kontrolle des Basenverbrauchs mit Thymolphthalein als Indikator) in erheblicher Menge Harnstoff- bzw. Hydantoin-Derivate als Folgereaktion eines hydrolytischen Angriffs der Urethanester-Gruppierung und eines so primär gebildeten N-Carbonyl-kations<sup>22–24</sup> (vgl. 3).



Nach unseren Beobachtungen werden die  $\alpha$ -Carboxylester um so schwerer alkalisch verseift, je geringer die Basizität der zugehörigen freien Säure ist. Der Dissoziationsgrad der Acylpeptidsäure wird dabei entscheidend beeinflusst von der Größe und Struktur der Seitenkette (durch deren elektronegativen Effekt und sicher zusätzlich durch sterische Hinderung) der carboxylendständigen Aminosäure als auch durch Verlängerung der Peptidkette. Verringert sich aus genannten Gründen die Hydrolyse-Geschwindigkeit der  $\alpha$ -Carbonsäureester, nähert sie sich damit mehr



carbonyl-Gruppierung schreitet. Auch die von Boissonnas und Preitner<sup>7</sup> diskutierten *Phenyl-* und *Tolyl-urethane*, die mittels katalytisch erregtem Wasserstoff quantitativ in Richtung freies Amin gespalten werden können, haben keine Bedeutung erlangt.

Weitgehende Beachtung verdienen hingegen die Versuche von Albertson und McKay, den üblichen Carbobenzyloxy- vor allem durch *Carbo-tert.-butyloxy-*, *Carbocyclopentyloxy-* und *Carbocyclohexyloxy-* Reste zu ersetzen. Diese Aminosäure- bzw. Peptidderivate zeichnen sich durch hervorragende Kristallisationseigenschaften aus. Die Amino-Blockierung ist mittels Halogenwasserstoff-Solvolyse in Eisessig oder Nitromethan glatt reversibel, wobei die Reaktionszeiten beim Carbocyclopentyloxy- etwa denen des Carbobenzyloxy-Rests gleichen. Cyclohexyloxy-carbonyl-Derivate werden mittels Bromwasserstoff-Eisessig erst bei 60° rasch gespalten (vgl. dazu Lautsch und Schulz<sup>35</sup>), während *tert.-Butyloxy-carbonyl-* Verbindungen bereits beim Einleiten von Chlorwasserstoff in deren Lösungen (Nitromethan oder Eisessig) spontan unter Kohlendioxid-Entwicklung zerfallen<sup>34,36</sup>. Im Hinblick auf diese milde Spaltungsbedingung eignet sich die *Carbo-tert.-butoxy-* Gruppe für die einwandfreie Synthese von Tryptophan- und darüber hinaus auch von Methioninpeptiden, da nach den Autoren keinerlei Anlagerungsreaktion des *tert.-Butylkations* an die Thioäthergruppierung zu einem Sulfoniumsalz beobachtet werden konnte. Die Reihe der Vorteile sei vervollständigt durch die Feststellung, daß erstens die durch Halogenwasserstoff-Solvolyse entstehenden Halogenide nicht tränenreizend sind und daß zweitens diese Schutzgruppen der hydrierenden Entacylierung widerstehen. Damit wird eine selektive Verwendung neben den Carbobenzyloxy-Resten ermöglicht.

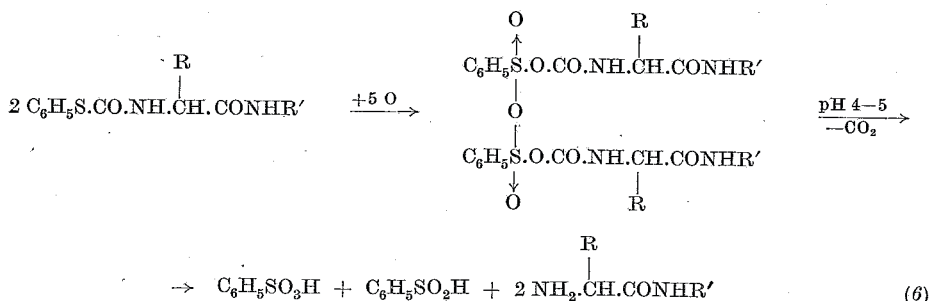
Die Cyclopentyloxy- und Cyclohexyloxy-carbonylierung von Aminosäuren gelingt glatt nach Schotten-Baumann; dagegen sind die *tert.-Butyloxy-carbonyl-* Verbindungen bislang nur über N-Carbonyl-aminosäureester in lohnender Ausbeute zugänglich<sup>34,36</sup>.

*Thiourethane*. Die von Ehrensverd<sup>37</sup> mit dem *Phenylthiocarbonyl-* Rest neu eingeführte Aminoschutzgruppe hatte lange Zeit der erfolgreichen peptidsynthetischen Verwendung getrotzt, da die vom Autor vorgeschlagene Spaltung mit schwach alkalischen Reagenzien (Bleihydroxyd, basisches Bleiacetat u. a.) nicht zum freien Peptid sondern primär zum N-Carbonyl-peptid-Kation führt, das sich in spontaner Reaktion zum Isocyanat umlagert. Innermolekularer Ringschluß zum Hydantoin-Derivat folgt auf dem Fuße<sup>38</sup>.

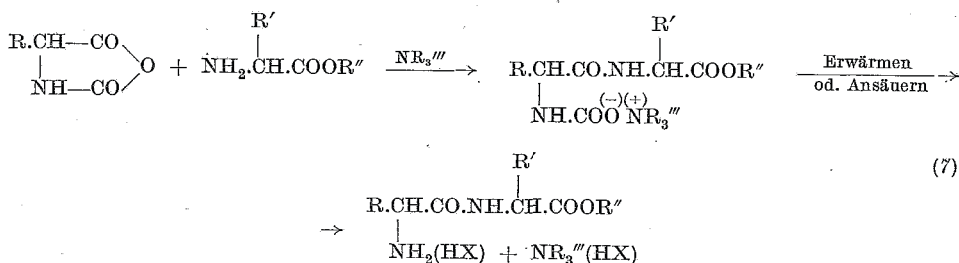
Kollonitsch und Mitarbeitern<sup>39</sup> gelang jedoch die Spaltung der Thiourethan-Gruppierung in Richtung freies Amin durch oxydative Behandlung mit Ozon oder besser organischen Persäuren und folgende milde, saure Hydrolyse des Oxydationsproduktes. Der von den Autoren vertretene Spaltungsmechanismus (6) scheint jedoch fraglich. Bei den in unserem Laboratorium unternommenen Versuchen<sup>40</sup>, Thiophenylester als oxydativ-spaltbare  $\alpha$ -Carboxylschutzgruppe der Peptidsynthese nutzbar zu machen, erzielten wir zwar Maximal-Ausbeuten beim Einsatz von 5–6 Äquivalenten Sauerstoff pro 2 Mol Thioester, doch konnten wir zu keinem Zeitpunkt eine Sulfinsäure im Reaktionsgemisch nachweisen. Die sehr störende Alkaliempfindlichkeit des Phenylthiocarbonyl-Restes konnte gleichfalls Kollonitsch<sup>41</sup> durch Einführen der *Benzyloxy-* bzw. *n-Butyl-* Analoga bannen. Diese Schutzgruppen lassen sich auch durch direkte Acylierung mittels Chlorameisensäurethioester in Natriumhydrogencarbonat-Gegenwart in Aminosäuren einführen. Erwähnt sei ferner

### Amino-Schutzgruppen

noch die weitgehende Beständigkeit der Thiourethane gegenüber Halogenwasserstoff-Eisessig<sup>41</sup>.



Salze der Carbamidsäure- (bzw. Dithiocarbamidsäure-) Derivate von Peptidestern, die als erstes Reaktionsprodukt bei der systematischen Synthese von Peptiden mit Hilfe von Oxazoliddionen oder deren Dithio-Analoga nach Bailey<sup>42</sup> bzw. Cook und Levy<sup>43</sup> auftreten, bewirken den Schutz der Aminogruppe der Kopfkomponente und verhindern die für N-Carbonsäure-anhydride bekannte Polykondensation. In der Folge wird diese Aminoblockierung durch gelindes Erwärmen oder Behandeln mit alkoholischer Salzsäure aufgehoben (7).



### Andere Acylgruppen

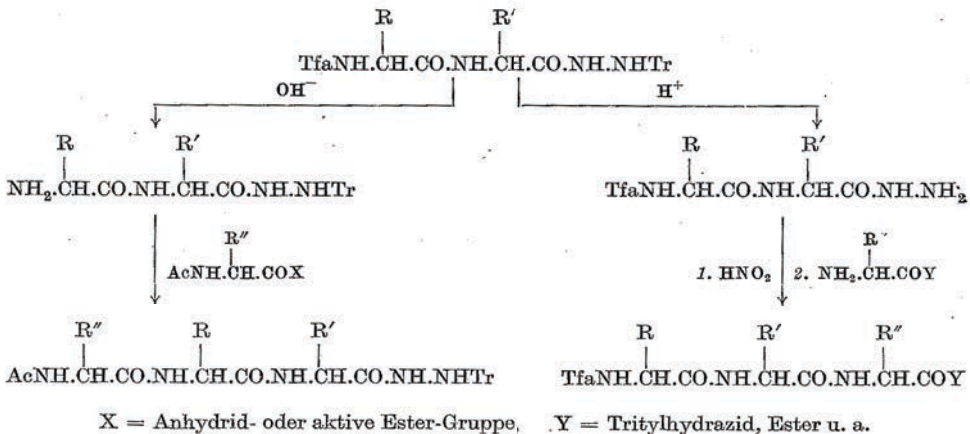
Die von Waley<sup>44</sup> am Beispiel der Synthese von N<sup>α</sup>-Tyrosyl-N<sup>ε</sup>-carbobenzoxy-lysin-benzylester erfolgreich benutzte N-Formylgruppe hat den Vorteil einer relativ sehr leichten Abspaltbarkeit mit 0,5 – 1N alkoholischer Salzsäure bei Raumtemperatur. Da die Darstellung von N-Formyl-aminosäuren nach Stoll und Mitarbeitern<sup>45</sup> mittels Ameisensäure-Acetanhydrid mit sehr guten Ausbeuten gelingt, scheint eine willkommene Bereicherung des Amino-Schutzes gegeben (vgl. auch die neue Glutathionsynthese von King und Mitarbeitern<sup>46</sup>). Diese ausgezeichneten Voraussetzungen werden jedoch erheblich geschmälert durch die Feststellung Hillmanns<sup>47</sup>, daß sich die Formyl-aminosäuren nach der gemischten Anhydridmethode nur schlecht umsetzen lassen. King und Mitarbeiter<sup>48</sup> konnten zeigen, daß dieses Handicap auf einer weitgehenden Bildung des Kations RO.CO(+) anstelle von HCO.NH.CH<sub>2</sub>CO(+) beruht.

Der *Trifluoressigsäure*-Rest als Amino-Schutzgruppe wurde 1952 von Weygand und Mitarbeitern<sup>49,50</sup> in die Peptidsynthese eingeführt; in den darauffolgenden Jahren haben die Autoren in systematischer Arbeit die Möglichkeiten und Grenzen der Methode aufgezeigt.

Die Darstellung der Trifluoracetyl-aminosäuren gelingt am besten und ohne Racemisierung bei optisch-aktivem Material mit 1 Äquivalent Trifluoressigsäureanhydrid in wasserfreier Trifluoressigsäure, wobei auch die N<sup>α</sup>-Trifluoracetyl-Derivate von mehrfunktionellen Aminosäuren glatt erhalten werden<sup>51</sup>. Im Falle des Lysins und Ornithins wird hierbei die ε-Aminogruppe durch Salzbildung blockiert, im Falle der aliphatischen Hydroxyaminosäuren auch die Hydroxylgruppe mitacyliert<sup>52</sup>. Tyrosin und Tryptophan werden am besten in einem Trifluoressigsäure-Äther-Gemisch in die N<sup>α</sup>-Trifluoracetyl-Verbindungen übergeführt<sup>51</sup>. Peptide werden unter diesen Bedingungen nicht nur an der Aminogruppe, sondern zum Teil auch an der Peptidbindung trifluoracetyliert; eine Ausnahme bilden lediglich die Prolinpeptide, die keinen acylierbaren Amidstickstoff mehr enthalten<sup>53</sup>.

Ein Überschuß des Acylierungsmittels führt zur Bildung der gemischten Anhydride (unter Erhitzen zu Azlactonen), die für die weitere nucleophile Umsetzung herangezogen werden können<sup>54</sup>. Leider geht hierbei die optische Aktivität verloren; eine Ausnahme bilden außer Trifluoracetyl-glycin nur die Trifluoracetyl-Derivate des L-Prolins, der L-Glutaminsäure und der L-Asparaginsäure, die optisch aktive symmetrische bzw. innere Anhydride liefern<sup>51,55</sup>.

Eine zusätzliche Darstellungsmethodik haben Calvin und Mitarbeiter<sup>56</sup> beschrieben. Als Acyldonator bedienen sich die Autoren des Trifluoressigsäurethioäthylesters bei pH 8–9 in wäßriger Lösung; Tyrosin, Tryptophan, Asparagin und Arginin geben einwandfreie N<sup>α</sup>-Verbindungen. Lysin und Ornithin mit freier ε- bzw. δ-Aminogruppe werden in ω-Stellung trifluoracetyliert, ohne daß die anderen beiden funktionellen Gruppen blockiert werden müssen.

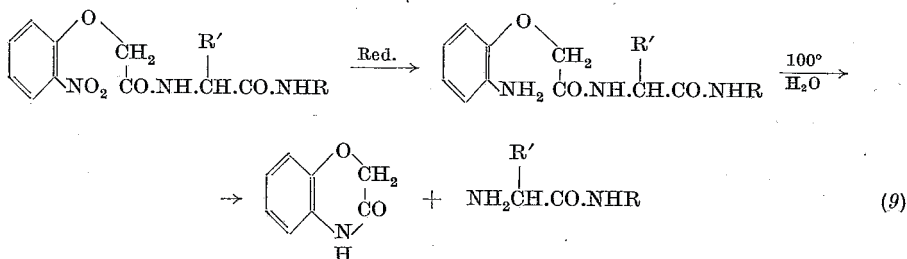


(8)

Trifluoracetyl-aminosäuren und -peptide unterliegen rasch der Spaltung durch verdünnte Natronlauge<sup>49</sup>, Bariumhydroxyd-Lösung<sup>57</sup> oder wäßrigen Ammoniak<sup>56</sup>. Damit stellt diese Schutzgruppe die einzige alkalisch einwandfrei spaltbare Aminoblockierung dar. Desweiteren gelingt die Entacylierung auch mittels alkoholischer Salzsäure<sup>55</sup> als Folge einer intermolekularen N→O Acylwanderung. Da auch die Herstellung der Peptidbindung aus Trifluoracetyl-Kopfkomponenten unter verschiedenen Variationen — Phosphorazo-, Säure-

chlorid-, aktive Ester-, Dicyclohexylcarbodiimid-Methode — möglich ist<sup>49,50,53,56,57</sup>, dürfte dem Trifluoracetyl-Rest neben den Urethan- und Trityl-Schutzgruppen für die Zukunft eine führende Rolle in der Peptidsynthese zukommen. Dies um so mehr, als mit der Kombination Trifluoracetyl-N-Tritylhydrazid der Weygandschen Schule ein weiterer Erfolgsschritt geglückt ist. Wahlweise läßt sich aus solchen Verbindungen der Trifluoracetyl-Rest alkalisch entfernen und das verbleibende Peptid-N'-trityl-hydrazid nucleophil umsetzen oder das freie Trifluoracetyl-peptid-hydrazid durch saure Abspaltung der Tritylgruppe gewinnen, das dann über das Azid mit Aminosäure- oder Peptidestern (evtl. auch wieder mit Trityl-hydraziden) gekuppelt werden kann<sup>60</sup> (8).

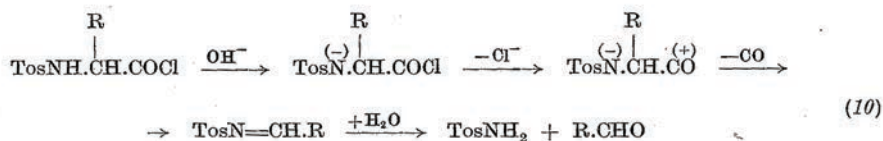
Unter der Bezeichnung „Lactamschutzgruppen“ sind die von Holley und Holley<sup>61</sup> vorgeschlagenen *o*-Nitrophenoxyacetyl- und *o*-Nitro-*p*-carbomethoxyphenylglycyl-Reste zu verstehen. Nach Reduktion der Nitrogruppe und anschließendem Erhitzen der Verbindung in Wasser auf 100° erfolgt die Entacylierung unter Lactamcyclisierung und Regenerierung des freien Amino-Derivats (9). Bislang wurde von dieser Möglichkeit des Amino-Schutzes jedoch kein Gebrauch mehr gemacht.



*Pyrrolidoncarbonsäure* als innermolekulares N-Acyl-Derivat der Glutaminsäure wurde von Boothe und Mitarbeitern<sup>62</sup> zur Synthese von Peptiden dieser Aminosäure herangezogen. Nach erfolgter Verknüpfung der Komponenten erfolgt die Ringöffnung durch Behandeln mit alkoholischer Salzsäure in der Wärme. Es bleibt aber dahingestellt, ob bei dieser Entacylierungsmethodik nicht doch ein weitgehender Angriff auf die Peptidbindung erfolgt (vgl. dazu<sup>7</sup>).

Die Beobachtung du Vigneauds und Behrens<sup>63</sup>, daß sich der *Toluolsulfonyl*- (*Tosyl*)- in Analogie zum Carbobenzoxy-Rest reaktiv mit Natrium in flüssigem Ammoniak abspalten läßt, hat diese Schutzgruppe zu einer der meistgebrauchten der modernen Peptidsynthese gemacht. Es sei hier nur kurz auf die Darstellung der Hypophysenhormone Oxytocin und Vasopressin verwiesen<sup>64-73</sup>. Vor allem bei der Synthese von Lysin- und Ornithin-Peptiden bedient man sich gerne der  $\omega$ -Tosyl-Derivate dieser Aminosäuren<sup>67-69,74-77</sup>, um die zweite Aminofunktion zeitlich verschieden zu blockieren. Der peptidsynthetische Einsatz der Tosylaminosäuren, die man leicht nach Schotten-Baumann aus Tosylchlorid und Aminosäure erhält, geschieht weitgehend nach der Säurechlorid-, Azid-, Pyrophosphit- oder Carbodiimid-Methode. In diesem Zusammenhang verdienen Ergebnisse von Beecham<sup>78,79</sup> Beachtung, nach denen es beim Umsatz von Tosylaminosäure-chloriden (bzw. -aziden) mit Aminosäuren in Alkaligenwart zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann (10).

Unter dem Einfluß freier Hydroxylionen spaltet die Sulfonamidgruppierung ein Proton ab; das erhaltene Anion stabilisiert sich unter Abgabe eines Chloranions zum Zwitterion und weiter unter Kohlenstoffmonoxyd-Eliminierung zum N-tosylierten Imin. Folgende Hydrolyse läßt als Endprodukte Tosylamid und eine von der Ausgangsaminosäure abhängige Carbonylkomponente (Aldehyd) auftreten.



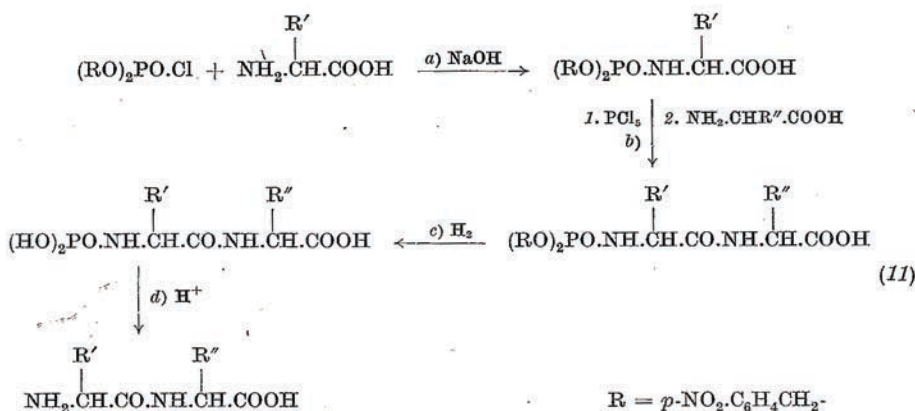
Diese Nebenreaktion tritt vor allem bei Aminosäure-Derivaten mit großer und stark verzweigter Seitenkette auf; sie wird durch den elektronenabstoßenden Effekt dieser  $\alpha$ -Substituenten gefördert. Sie unterbleibt bei Tosylglycin, -prolin, - $\beta$ -alanin sowie -pyrrolidoncarbonsäure, und kann bei den übrigen Aminosäure-Derivaten mittels pH-Kontrolle, Magnesiumoxyd als chlorwasserstoffbindendem Agens oder Arbeiten im Zweiphasensystem praktisch ausgeschaltet werden. Für Tosylaminosäureazide gilt ein ähnlicher Mechanismus.

Auch die Nichtverwendbarkeit der gemischten Anhydridmethode nach Wieland-Boissonnas-Vaughan basiert auf dem stark aciden Wasserstoff der Sulfonamidgruppierung<sup>47</sup>; über den Mechanismus bzw. die entstehenden Reaktionsprodukte ist bislang nichts bekannt. Die eingangs erwähnte Entacylierung mittels Natrium in flüssigem Ammoniak bot lange Zeit im Hinblick auf die anfallende Menge Natriumionen besondere Schwierigkeiten bei der Peptidisolierung. Sie ist heute durch eine vollendete Ionenaustausch-Technik behoben<sup>80,81</sup>. Nach Rudinger und Mitarbeitern<sup>82</sup> läßt sich die Detosylierung auch mit Bromwasserstoff und Phenol in Eisessig bewerkstelligen — eine Ergänzung zur ursprünglichen Abspaltungstechnik von Schönheimer<sup>83</sup>. Bemerkenswert ist ferner die Beobachtung von Hillmann<sup>47</sup>, wonach Tosyl-glycyl-aminosäuren bzw. -peptide beim Erwärmen mit 4—5*N* alkoholischer Salzsäure den Tosylglycyl-Rest abspalten; Aminosäure- oder Peptidester-Hydrochloride fallen in 60—80%iger Ausbeute an.

Der Vorschlag von Milne und Peng<sup>84</sup> den Tosylrest durch die *Benzylsulfon*yl-Gruppe zu ersetzen, bedeutet keinerlei Vorteil, obgleich neben der reduktiven Entfernung auch die Spaltung der Sulfonamidbindung mit Raney-Nickel möglich ist.

*Phosphatamide* als N-blockierte Aminosäure-Derivate hat erstmals Zervas<sup>85</sup> für die Peptidsynthese vorgeschlagen. Diese Möglichkeit basiert auf der Reaktionsträgheit von substituierten O-Dialkyl-phosphorsäureamiden gegenüber Carbonsäuren; erst in der Schmelze (über 150°) tritt die Aktivierung der Aminogruppe in den Vordergrund, wobei nach Goldschmidt und Mitarbeitern<sup>86,87</sup> Carbonsäureamide in ausgezeichneter Ausbeute erhalten werden. Di-nitrobenzyl-phosphat-aminosäuren, die leicht aus dem substituierten Phosphorsäurechlorid und Aminosäuren zugänglich sind (*Ila*), lassen sich z. B. nach der Säurechloridmethode mit nucleophilen Komponenten umsetzen (*Iib*). Mittels katalytisch erregtem Wasserstoff (*Iic*) erhält man die freien N-Phosphatpeptide, deren P-N-Bindung bei pH 4 rasch der Hydrolyse anheimfällt (*Iid*).

### Amino-Schutzgruppen



Phospho-aminosäureanhydride (Phospho-Analoga der Oxazolid-2,5-dione), die nach Keller<sup>88</sup> aus Dichlor-alkyl(aryl)-phosphat und Aminosäuren und folgender Behandlung des Reaktionsprodukts mit Schwefeltrioxyd in Phosphor-oxychlorid entstehen, reagieren mit Aminoderivaten glatt zu Amiden (N-Alkyl(-aryl)-phospho-aminosäure-amiden). Über die Abspaltung der Schutzgruppe wurde nicht berichtet.

### Diacyl-Verbindungen

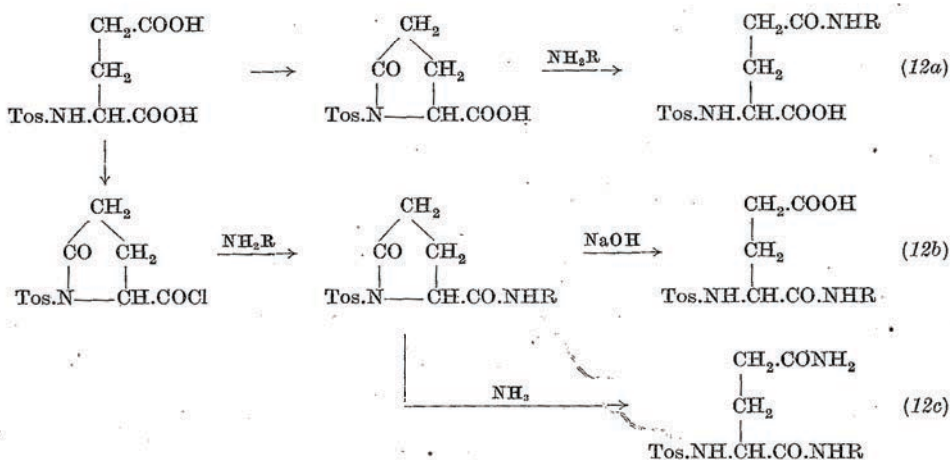
Der von Kidd und King<sup>89</sup> und etwas später von Sheehan und Frank<sup>90</sup> für die Peptidsynthese nutzbar gemachte *Phthalylrest* hat sich bislang wenig durchgesetzt. Trotz seiner gewissen Vorzüge, z. B. der großen Kristallisationsfreudigkeit der Phthalylderivate, der glatten Entacylierung auch S-haltiger Verbindungen mittels Hydrazin und neuerdings auch Phenylhydrazin<sup>91</sup>, Beständigkeit und guter Handhabung der entsprechenden Säurechloride, bedeutet die verhältnismäßig leichte Aufspaltung zur Phthalamido-Gruppierung beim Arbeiten in wäßriger Lösung vor allem in Gegenwart von Hydroxylionen ein großes Handicap (vgl. dazu Sheehan und Mitarbeiter<sup>92</sup> sowie Hanson und Illhardt<sup>93</sup>), um so mehr als *o*-Carboxybenzoyl-amide hydrazinolytisch nicht mehr in Phthalhydrazid und Amino-Komponente gespalten werden können. Die von Boissonnas<sup>94</sup> beschriebene alkalische Verseifung von Phthalylpeptidestern zu Phthalylpeptiden scheint daher ein Sonderfall zu sein.

Zur Darstellung optisch-aktiver Phthalyl-aminosäuren erwies sich die einfachste Acylierungsmethodik, Zusammenschmelzen von Phthalsäureanhydrid und Aminosäure, zunächst als nicht gangbar; der Umweg über die Phthalyl-aminosäureester bleibt jedoch umständlich und zeitraubend. Neuerdings konnten jedoch King<sup>95</sup> und Sheehan<sup>96</sup> zeigen, daß die direkte Acylierung bei Temperaturen unter 130° oder noch besser beim Erhitzen der Komponenten in Dioxan auf 105° bis zur völligen Lösung ohne Racemisierung verläuft. Erfolgversprechend scheinen auch die Versuche von Sheehan und Holland<sup>97</sup>, symmetrische Phthalsäure-thioester als Acyldonatoren einzusetzen; vor allem falls es gelingt, durch Verfahrensvariation höhere Ausbeuten an Phthalyl-derivaten zu erzielen.

*Maleinimido-Verbindungen* aus Maleinsäureanhydrid und Aminosäuren zu gewinnen (aliphatische Analoga der Phthalylderivate), scheiterte bislang.

So werden nach King und Mitarbeitern<sup>98</sup> nur die entsprechenden Halbamide erhalten.

Als ein spezielles Beispiel N-diacylierter Aminosäuren ist die N-Tosyl-pyrrolidon-carbonsäure anzuführen. Rudinger<sup>99,100</sup> und du Vigneaud<sup>81</sup> haben sich mit ausgezeichnetem Erfolg dieser N-blockierten Glutaminsäure-derivate vor allem bei der Synthese von Glutaminyl-peptiden bedient (12c), da nach erfolgter Peptidknüpfung der Tosyl-pyrrolidonring durch Ammoniak leicht zum  $\gamma$ -Amid der Glutaminsäure geöffnet werden kann. Die Krönung dieser Methode stellt zweifellos die Synthese des Oxytocins, Vasopressins und verschiedener Analoga dieser Hormone durch die beiden Autoren dar. Darüber hinaus schließt die leichte nucleophile Aufspaltung des Lactamringes eine Synthese von  $\gamma$ -Glutamylpeptiden ein<sup>100,101</sup> (12a).



### B. Alkylierung

Im Laufe der letzten Jahre hat die Alkyl-Blockierung der Aminogruppe die Möglichkeiten der Peptidsynthese erheblich bereichert.

N-Benzyl-aminosäuren, die u. a. durch katalytische Hydrierung und folgende Verseifung der Benzal-aminosäureester oder katalytische Debenzylierung der N,N-Dibenzyl-aminosäuren leicht zugänglich sind<sup>102,103</sup> lassen sich im Hinblick auf das reaktionsfähige Wasserstoff-Atom der sekundären Aminogruppierung fast nur in Form der Säurechlorid-Hydrochloride einsetzen<sup>103</sup>. Damit entspricht der Reaktionsverlauf einem Schutz der Aminogruppe durch Ammonsalzbildung (siehe weiter unten); doch wird mit dem N-Benzylrest eine erhebliche Stabilität gegenüber den Aminosäurechlorid-Hydrochloriden erreicht. Die Abspaltung der N-Benzyl-Schutzgruppe erfordert eine energiereichere katalytische Hydrierung bei 60–70° und geringem Druck.

Der zweite Vertreter der N-Mono-alkyl-derivate, die N-Triptyl-Verbindung, hat sich rasch zu einer der meist gebrauchten Aminenschutzgruppen emporgespielt. Der räumliche Bau des Triphenylmethyl-Rests bewirkt eine so weitgehende Maskierung, daß trotz des verbleibenden Wasserstoff-Atoms am Stickstoff eine Aktivierung der Carboxylgruppe durch Anhydridbildung<sup>104,106</sup> oder mit Hilfe des Carbodiimid-Verfahrens<sup>19,107–110</sup> möglich wird. Darüber

hinaus erstreckt sich der sterische Effekt aber auch auf die  $\alpha$ -Carboxylgruppe; dies äußert sich u. a. in einer erschwerten alkalischen Verseifung und Hydrazidbildung der Trityl-aminosäureester (in zunehmendem Maße vom Glycin zum Phenylalaninderivat!). Naturgemäß sollte dann auch die nucleophile Umsetzung z. B. der Tritylaminosäure-alkylkohlenensäure-anhydride auf Schwierigkeiten stoßen. Dies ist in der Tat nach den Angaben von Zervas<sup>104</sup> und Hillmann<sup>105</sup> der Fall. Dieser Hinderungseffekt kommt mit Verlängerung der Peptidkette (schon ab Trityl-dipeptid) in Fortfall, so daß die große Bedeutung der Schutzgruppe mehr bei der Synthese höherer Peptide aus Peptidbruchstücken liegt.

Die Einführung des Tritylrests geschieht durch Kupplung von Tritylchlorid mit Aminosäure- bzw. Peptidestern und anschließende alkalische Verseifung der Trityl-Ester oder, für die Darstellung der Tritylaminosäuren einfacher, durch Umsatz von Tritylchlorid und Aminosäure in Isopropanol-Wasser bei Diäthylamin-Gegenwart<sup>104</sup>. Velluz und Mitarbeiter haben in eleganten Arbeiten<sup>107-110</sup> vor allem die Tritylierung multifunktionaler Aminosäuren und ihre Einbeziehung in die Peptidsynthese studiert. Im Falle der Tritylglutaminsäure- bzw. -asparaginsäureester läßt der ungleiche sterische Effekt des Tritylrests auf die beiden Carboxylgruppen des Moleküls eine partielle Esterverseifung zu und damit wahlweise eine folgende Synthese von  $\alpha$ - und  $\gamma$ - bzw.  $\beta$ -Peptiden dieser Aminosäuren. Die Abspaltung dieser Aminoschutzgruppe gelingt außer auf hydrogenolytischem Wege auch durch die katalytische Wirkung von Wasserstoffionen, z. B. durch Chlorwasserstoff in Dioxan, durch verdünnte Essigsäure oder wasserfreie Trifluoressigsäure. Vor allem die zweite Methodik der Entalkylierung läßt eine einwandfrei selektive Entfernung des Tritylrests in Gegenwart von Carbobenzoxy- oder aktivierten Estergruppen zu.

Velluz<sup>110</sup>, Boissonnas<sup>19</sup> und Schwyzer<sup>74</sup>, jeweils mit ihren Mitarbeitern, haben mit Synthesen des Oxytocins, eines Eikosapeptids mit ATCH-Struktur und des Gramicidin S die Handhabung von Trityl-Verbindungen erfolgreich demonstriert. Bemerkenswert ist ferner die Tatsache, daß bei  $N^{\alpha}, N^{\epsilon}$ -Ditryllysinpeptiden die Detrylierung durch Säuren nur an der  $N^{\alpha}$ -Gruppe einsetzt<sup>112</sup>.

$N,N$ -Dibenzyl-aminosäuren, als Vertreter der Dialkyl-Blockierung, haben Velluz und Mitarbeiter<sup>113,114</sup> empfohlen, da hier im Gegensatz zu den Monobenzylderivaten die Anwendung der „gemischten Anhydridmethoden“ erfolgreich ist. Die Abspaltung der Schutzgruppe läßt sich mittels katalytisch erregtem Wasserstoff in Eisessig bei 80° bewerkstelligen. Eine besondere Bedeutung ist dieser Verbindungsklasse jedoch kaum zuzuschreiben.

$N$ -Alkyliden-aminosäuren sind seit den Arbeiten der Bergmann-Schule<sup>115,116</sup> lange bekannt, aber erstmals von Wieland und Mitarbeitern<sup>117</sup> zu Umsetzungen herangezogen worden, die in unmittelbarer Verwandtschaft zur Peptidknüpfung stehen. Den Autoren gelang aus Benzylidenglycin-kalium mittels der gemischten Anhydridmethode die Darstellung von Benzylidenglycin-thiophenylester, der durch Wasserstoffionen spontan in Glycin-thiophenylester (als Hydrochlorid isoliert) und Benzaldehyd zerfällt.

### C. Alkyl-Acylierung

Einen Vertreter der  $N$ -Acyl- $N$ -alkyl-aminosäuren haben erstmals Weygand und Mitarbeiter<sup>55</sup> in Form der Trifluoracetyl-oxazolidone präsentiert. Dieser Verbindungstyp läßt sich leicht aminolytisch zu einem  $N$ -acylierten Aldehyd-



19. Boissonnas R. A., Guttman S., Waller J.-P., Jaquenoud J.-A.: *Experientia* 12, 446 (1956).
20. White J. E.: *J. Biol. Chem.* 106, 141 (1934).
21. Taschner E., Liberek B.: Abstr. 1-6, IV. *Intern. Kongreß f. Biochemie, Wien 1958.*
22. Schlögl K., Fabitschowitz H.: *Monatsh.* 84, 937 (1953).
23. Waley S. G., Watson J.: *J. Chem. Soc.* 1953, 475.
24. Wunsch E.: *Dissertation.* Universität München 1955.
25. Rittel W., Iselin B., Riniker B., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 40, 614 (1957).
26. Vaughan J. R. jr., Eichler J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5556 (1953).
27. Channing C. M., Turner P. B., Young G. T.: *Nature* 167, 487 (1951).
28. Carpenter F. H., Gish D. T.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3818 (1952).
29. Gish D. T., Carpenter F. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 950 (1953).
30. Berse C., Piché L.: *J. Org. Chem.* 21, 808 (1956).
31. Berse C., Boucher R., Piché L.: *J. Org. Chem.* 22, 805 (1957).
32. Schwyzer R., Sieber P., Zatskó K.: *Helv. Chim. Acta* 41, 491 (1958).
33. Stevens C. M., Watanabe R.: *J. Am. Chem. Soc.* 72, 725 (1950).
34. McKay F. C., Albertson N. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686 (1957).
35. Lautsch W., Schulz G.: *Naturwiss.* 45, 58 (1958).
36. Anderson G. W., McGregor A. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6180 (1958).
37. Ehrensvärd G. C. H.: *Nature* 159, 500 (1947).
38. Lindenmann A., Khan N. H., Hofmann K.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 476 (1952).
39. Kollonitsch J., Hajós A., Gábor F.: *Chem. Ber.* 89, 2288 (1956).
40. Wunsch E., Hilpert H.: Bisher nicht veröffentlicht; Hilpert H.: *Diplom-Arbeit.* Universität München, 1957.
41. Kollonitsch J., Hajós A., Gábor F.: *Chem. Ber.* 89, 2293 (1956).
42. Bailey J. L.: *J. Chem. Soc.* 1950, 3461.
43. Cook A. H., Levy A. L.: *J. Chem. Soc.* 1950, 646.
44. Waley S. G.: *Chem. & Ind. (London)* 1953, 107.
45. Stoll A., Petrzilka Th.: *Helv. Chim. Acta* 35, 589 (1952).
46. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* 1957, 880.
47. Hillmann S., Hillmann G.: *Z. Naturforsch.* 6b, 340 (1951).
48. King F. E., Clark-Lewis J. W., Smith G. R.: *J. Chem. Soc.* 1954, 1044.
49. Weygand F., Csendes E.: *Angew. Chem.* 64, 136 (1952).
50. Weygand F.: *Chem. Ztg.* 78, 480 (1954).
51. Weygand F., Geiger R.: *Chem. Ber.* 89, 647 (1956).
52. Weygand F.: *Privatmitteilung.\**
53. Weygand F., Geiger R., Glöckler U.: *Chem. Ber.* 89, 1543 (1956).
54. Weygand F., Glöckner U.: *Chem. Ber.* 89, 653 (1956).
55. Weygand F., Reiher M.: *Chem. Ber.* 88, 26 (1955).
56. Schallenberg E. E., Calvin M.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2779 (1955).
57. Taurog A., Abraham S., Chaikoff I. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3473 (1953).
58. Weygand F., Geiger R.: *Chem. Ber.* 90, 634 (1957).
59. Weygand F., Swodenk W.: *Chem. Ber.* 90, 639 (1957).
60. Weygand F.: *Privatmitteilung.\*\**
61. Holley R. W., Holley A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1110, 3069, 5445 (1952).
62. Angier R. B., Waller C. W., Hutchings B. L., Boothe J. H., Mowat J. H., Samb J., SubbaRow Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 74 (1950).
63. Du Vigneaud V., Behrens O. K.: *J. Biol. Chem.* 117, 27 (1936).
64. Katsoyannis P. G., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3113 (1954).
65. Du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3115 (1954).
66. Popenoe E. A., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 6202 (1954).
67. Katsoyannis P. G., Gish D. T., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4516 (1957).
68. Roeske R., Stewart F. H., Stedman R. J., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5883 (1956).
69. Du Vigneaud V., Bartlett M. F., Jöhl A.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5572 (1957).
70. Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 109 (1957).
71. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: *Diese Zeitschrift* 21, 202 (1956).
72. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: *Diese Zeitschrift* 21, 707 (1956).
73. Honzl J., Rudinger J.: *Diese Zeitschrift* 20, 1190 (1955).

\* Siehe Weygand F., Rinno H.: *Chem. Ber.* 92, 517 (1959).

\*\* Siehe Weygand F., Steglich W.: *Chem. Ber.* 92, 313 (1959).

*Diskussion*

74. Iselin B., Rittel W., Sieber P., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 40, 373 (1957).
75. Harris J. I., Work T. S.: *Biochem. J.* 46, 196 (1950).
76. Harris J. I., Work T. S.: *Biochem. J.* 46, 582 (1950).
77. Erlanger B. F., Sachs H., Brand E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1806 (1954).
78. Beecham A. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3257 (1957).
79. Beecham A. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3257 (1957).
80. Rudinger J.: *Diese Zeitschrift* 19, 375 (1954).
81. Swan J. M., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3110 (1954).
82. Poduška K., Rudinger J., Šorm F.: *Diese Zeitschrift* 20, 1174 (1955).
83. Schönheimer R.: *Z. physiol. Chem.* 154, 203 (1926).
84. Milne H. B., Peng C.-H.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 639 (1957).
85. Zervas L., Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5351 (1955).
86. Goldschmidt S., Obermeier F.: *Ann.* 588, 24 (1954).
87. Goldschmidt S., Krauss H. L.: *Ann.* 595, 193 (1955).
88. Keller H.: *Abstr. 1-12, IV. Intern. Kongreß f. Biochemie, Wien 1958.*
89. Kidd D. A. A., King F. E.: *Nature* 162, 776 (1948).
90. Sheehan J. C., Frank V. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 71, 1856 (1949).
91. Schumann I., Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* 35, 2235 (1952).
92. Sheehan J. C., Chapman D. W., Roth R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3822 (1952).
93. Hanson H., Illhardt R.: *Z. physiol. Chem.* 298, 210 (1954).
94. Schumann I., Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* 35, 2237 (1952).
95. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* 1957, 886.
96. Sheehan J. C., Goodman M., Hess G. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1367 (1956).
97. Sheehan J. C., Holland G. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5631 (1956).
98. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R., Swindin W. A.: *J. Chem. Soc.* 1957, 873.
99. Rudinger J.: *Chem. listy* 48, 235 (1954); *diese Zeitschrift* 19, 356 (1954).
100. Rudinger J.: *Chem. listy* 48, 244 (1954); *diese Zeitschrift* 19, 375 (1954).
101. Rudinger J., Czurbová H.: *Chem. listy* 48, 254 (1954); *diese Zeitschrift* 19, 386 (1954).
102. Scheibler H., Baumgarten P.: *Ber.* 55, 1358 (1922).
103. Velluz L., Amiard G., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1954, 1012.
104. Zervas L., Theodoropoulos D. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1359 (1956).
105. Hillmann-Elies A., Hillmann G., Jatzkewitz H.: *Z. Naturforsch.* 8b, 445 (1953).
106. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1955, 191.
107. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1955, 1464.
108. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 97.
109. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 698.
110. Velluz L., Amiard G., Bartos J., Goffinet B., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 1464.
111. Amiard G., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1957, 1373.
112. Amiard G., Goffinet N.: *Bull. soc. chim. France* 1957, 1133.
113. Velluz L., Amiard G., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1954, 1012.
114. Velluz L., Anatol J., Amiard G.: *Bull. soc. chim. France* 1954, 1449.
115. Bergmann M., Ennsin H., Zervas L.: *Ber.* 58, 1034 (1925).
116. Bergmann M., Zervas L.: *Z. physiol. Chem.* 152, 282 (1926).
117. Wieland T., Schäfer W.: *Ann.* 576, 104 (1952).
118. Micheel F., Thomas S.: *Chem. Ber.* 90, 2906 (1957).
119. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* 1957, 880.
120. Fischer E.: *Ber.* 38, 605 (1905).



Agens in einer mir bisher nicht erklärlichen Weise verhindert, so daß leider diese an sich theoretisch sehr bequeme Abspaltungsmethode nicht zum Erfolg geführt hat. Wir haben auch einmal ausgesprochen, daß man von Indolylacetylverbindungen ausgehen könnte. Der Indolrest ist photosensibel, besonders in Gegenwart von Sensibilisatoren, und wir haben einige Vorversuche angestellt. Indolylacetyl- oder auch Indolylcarbonylpeptide lassen sich durch längeres Belichten von der Endgruppe befreien. Allerdings waren die Papierchromatogramme, die man zur Analyse angestellt hat, nicht sehr ermutigend, und deshalb haben wir diese Versuche nicht weiter fortgesetzt.

Und schließlich darf ich Herrn Wünsch noch insofern ergänzen, als in letzter Zeit Kuhn in Heidelberg den Phenylrest am Stickstoff auch als abspaltbar gefunden hat und zwar durch den Spezialekatalysator Palladiumhydroxyd auf Bariumsulfat-hydrat [Kuhn R., Haas H. J.: Ann. 611, 57 (1958)]. Mit diesem Katalysator läßt sich der Phenylrest des Anilins zu Cyclohexan hydrieren und dabei wird die Aminogruppe freigelegt.

GOLDSCHMIDT: Ich möchte noch einen kurzen Nachtrag geben zu dem, was Herr Wünsch vorhin über die Phthalylverbindungen ausgeführt hat. Wenn man den Phthalyl-glycin-äthylester verseift, dann findet zunächst immer eine Aufspaltung des Phthalylrings statt, wie wir vor Jahren schon gefunden haben. Aber wenn man die zunächst entstandene Verbindung wieder erwärmt, dann kann man sie wieder unter Abspaltung von Wasser in die Phthalylverbindung zurückführen.

WÜNSCH: Das mag bei Phthalylaminosäureestern gehen, aber wir haben bei Peptidestern dann nachher immer im Chromatogramm Phthalamidoverbindungen gefunden. Das hat auch Hanson bestätigt [Hanson H., Illhardt R.: Z. physiol. Chem. 298, 210 (1954)].

WIELAND: Ich würde vorschlagen, zur Recyclisierung von Phthalamidoverbindungen das Dicyclohexylcarbodiimid zu versuchen. Haben Sie das einmal versucht, Herr Wünsch?

WÜNSCH: Nein.

GOLDSCHMIDT: Sie brauchen das gar nicht, es genügt einfaches Erwärmen.

RUDINGER: Es geht mit Carbodiimid. Herr Zaoral hat das gemacht.

WIELAND: Damit könnte man vielleicht auch den Maleinylrest cyclisch hereinbringen.

GOLDSCHMIDT: Ich möchte noch etwas zu der Arylthiocarbonylschutzgruppe sagen. Diese Verbindungen sind zwar in saurer Lösung beständig, aber zu Peptidsynthesen sind sie außerordentlich wenig geeignet. Sobald man in irgendeiner Phase der Umsetzungen den pH 7 überschreitet, spaltet sich der Arylthiocarbonylrest ab.

WÜNSCH: Deshalb hat man auch die Phenylthiocarbonylverbindungen verlassen; dagegen sind die Benzyl- oder *n*-Butylthiocarbonylverbindungen stabil. Z. B. kann man mit Benzylthiocarbonylchlorid Aminosäuren in Gegenwart von Bicarbonat acylieren. *N*-Phenylthiocarbonylderivate werden bereits beim Aufbewahren in Glas, also durch die Alkalität des Glases, angegriffen.

GOLDSCHMIDT: Ja, selbst wenn die Peptidsynthese gelingt — bei der Aufarbeitung hat man eine Phase, wo man mit Bicarbonat arbeiten muß.

WÜNSCH: Allerdings hat die Phenylthiocarbonylgruppe ev. auch Vorteile. Man verseift die Phenylthiocarbonylaminosäureester sauer und isoliert die Säuren praktisch gar nicht, sondern macht anschließend z. B. durch Pyridinzusatz alkalisch und erwärmt; es tritt Bildung des *N*-Carbonylkations auf, das sich über das Isocyanat in das Oxazolidon umlagert. Man bekommt in der Folge sofort Polypeptide. Das ist ja eine sehr nette Synthese von Polypeptiden.

GOLDSCHMIDT: Diese sind äußerst uneinheitlich. Man kann immer nachweisen, daß die Polymerisate Hydantoinreste halten. Außerdem entstehen Diketopiperazine — im Ganzen also ein recht kompliziertes Gemisch.

RUDINGER: Um noch auf den Mechanismus der Spaltung der Carbobenzoxygruppe zurückzukommen: Wir hatten ein *p*-Nitrocarbobenzoxy-isoleucyl-peptid, ein Heptapeptid in der Oxytocinreihe, und das wurde unter den normalen Bedingungen der Decarbobenzoxylierung mit Bromwasserstoff praktisch nicht gespalten. Auch das *p*-Nitrocarbobenzoxyisoleucin selbst wird sehr langsam gespalten. Andererseits ist es aus diesen Versuchen mit neuen Schutzgruppen bekannt, daß *p*-Methoxycarbobenzoxyderivate besonders leicht gespalten werden, also ein sehr starker normaler Substituenteneffekt, wie man ihn erwarten würde, wenn da doch ein Sauerstoff in der Nähe des Arylmethylrests protonisiert würde; man würde wohl kaum erwarten, daß der Einfluß so stark bis auf den Stickstoff übertragen würde. Vielleicht spielen auch beide dieser Protonisierungen eine Rolle bei dem ganzen Prozeß.

BRENNER: Das Schwyzer'sche *p*-Methoxyphenylazobenzylcarbonyloxyderivat wird auch sehr leicht gespalten.

WIELAND: Darin sehe ich keinen Widerspruch zu der Theorie, die wir aufgestellt haben; denn es könnte ja einfach so sein, daß der elektronenziehende Substituent das letzte Übergleiten des Elektronenpaares zwischen  $\text{CH}_2$  und Sauerstoff verhindert. Das Elektronenpaar muß einen Stoß kriegen, den bekommt es durch negativierende Substituenten in *para*-Stellung, wie die Methoxygruppe und auch die Azogruppierung.

RUDINGER: So daß die Imidbildung die Protonisierung verhindern würde, und die negativen Substituenten im Kern dann die Elektronenverschiebung, die darauf folgen muß, um zur Spaltung zu führen?

WIELAND: Ja.

RUDINGER: Ihre Erfahrung mit den Imiden hat ja wahrscheinlich auch Bezug auf die Stabilität der Tosyllactame gegenüber Bromwasserstoff; diese Detosylierung mag ja auch eine Protonisierung des Stickstoffatoms verlangen.

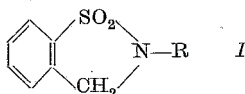
WIELAND: Ja, Imidstickstoff wird sehr schlecht protonisiert, er ist fast nicht mehr basisch.

WICHTERLE: Durch die Einführung des zweiten Acyls wird die Basizität des Sauerstoffs ebenso wie die des Stickstoffs herabgesetzt, also kann auch die Inhibierung der Protonisierung des Sauerstoffs durch die Einführung des zweiten Acylrestes verantwortlich sein. Es wird eben beides ganz parallel beeinflußt.

WIELAND: Irgendwo muß man ja das Wasserstoffion lokalisieren in dem Intermediärprodukt.

WICHTERLE: Ich glaube, das ist keine so ernste Frage, wo eigentlich die Protonisierung einsetzt, den beides führt zu ein und demselben Ergebnis, und es kann ja parallel beides gleichzeitig wirken.

RUDINGER: Noch eine Bemerkung zur Frage der Acyl-alkyl-derivate, und zwar ist es ein Einfall und eine Vorarbeit von Herrn Zaoral. Es handelt sich um Derivate des Typs I, also um Sultame:



Normal wären solche Aminosäurederivate nicht besonders interessant, aber bei der Diaminobuttersäure ist der zweite Wasserstoff der  $\gamma$ -Aminogruppe oft sehrstörend, und wir haben uns darum nach Gruppen umgesehen, die beide Wasserstoffatome dieser Aminogruppe blockieren könnten. Einstweilen haben wir nur das Modell vom Glycin (I, R =  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) mit Benzylehloridsulfoclorid dargestellt. Da man Benzyl und auch Sulfamidgruppen mit Natrium in flüssigem Ammo-

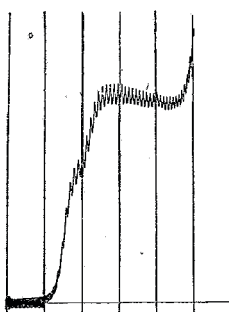


Abb. 1

Polarographische Welle des Phthalylglycins

Ab  $-0,8$  V,  $200$  mV/Absz.

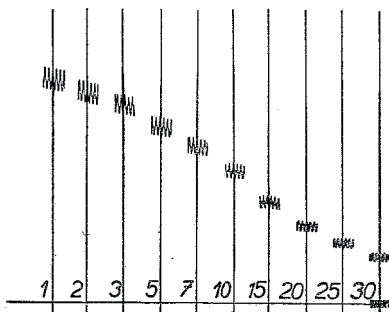


Abb. 2

Diffusionsstrom der Phthalylglycin-Welle

Bei  $-1,4$  V, an der Abszissen Zeit nach Ansatz der Hydrolyse in Minuten.

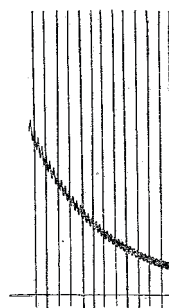


Abb. 3

Diffusionsstrom der Phthalylglycin-äthylester-Welle

Kontinuierlich bei  $-1,4$  V verzeichnet;  $10$  sek/Absz.

$1 \cdot 10^{-3}$ M Lösungen in einer Mischung (1 : 1) von Michaelis-Puffer, pH 11,04, und 99% Äthanol, gemessen bei  $25^\circ$  gegen die gesättigte Kalomelektrode,  $h = 50$  cm, Empf. 1 : 30.

Diskussion

niak spalten kann, sollte man diese Schutzgruppe auch so abspalten können. Unter den allgemein gebrauchten Reaktionsbedingungen entstehen aber zwei Produkte. Wenn man Säure — also Ammonsalz — in ziemlich hoher Konzentration zusetzt, und auch wenn man die Reduktion mit Lithium anstatt mit Natrium durchführt, dann findet vollständige Abspaltung statt.

Tabelle I

Alkalihydrolyse einiger Phthalimido-säuren; Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung

Säure	$k_2^{25^\circ}$ l.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
Phth-GlyOH	5,8
Phth-AlaOH	2,0
Phth-NorvalOH	0,77
Phth-LeuOH	0,55
Phth-ValOH	0,60
Phth- $\alpha$ -AibOH <sup>a</sup>	0,56

<sup>a</sup>  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure.

Tabelle II

Alkalihydrolyse einiger Phthalyl-aminosäuren und Phthalyl-peptide; Halbzeit-Werte (interpoliert)

Säure	Halbzeit (Minuten) bei		
	pH 9	pH 10	pH 11
Phth-GlyOH	200	20	2,0
Phth-AlaOH	585	58	5,8
Phth-LeuOH	2120	210	21,2
Phth-Gly-GlyOH	40	4	0,4
Phth-Leu-LeuOH	55	5,5	0,55

Tabelle III

Alkalihydrolyse der Phthalylgruppe einiger Phthalimido-säuren und derer Ester

Verbindung	$k_2^{25^\circ}$ , l.Mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>		
	-OH	-OMe	-OEt
Phth-Gly-	5,8	27,8	23,7
Phth-Leu-	0,55	6,8	
Phth- $\gamma$ -But- <sup>a</sup>	6,1	10,1	
Phth-Gly-Gly-	31,4		

<sup>a</sup>  $\gamma$ -Phthalimidobuttersäure.

In demselben Zusammenhang haben wir uns auch für die Phthalylgruppe interessiert. Es gibt in der Literatur widersprechende Behauptungen: meistens wird konstatiert, daß die Phthalylgruppe bei der Alkalität, die zur Verseifung der Estergruppe notwendig ist, nicht stabil ist, aber es gibt auch Beispiele, wo man Phthalyl-peptid-ester alkalisch zu Phthalyl-peptiden verseift haben soll [Schumann I., Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* 35, 2237 (1952)]. Wir haben diese Frage ein wenig quantitativ studiert, und zwar mit Herren Krupička, Černík und Zaoral. Das Verschwinden der Phthalylgruppe wurde polarographisch verfolgt, da sie ja polarographisch aktiv ist. Ein Beispiel ist in den Abbildungen angeführt: Abb. 1 ist die Phthalyl-Welle, Abb. 2 ist eine kinetische Messung, bei der alle ein bis fünf Minuten der Diffusionsstrom bei konstantem Potential registriert wurde. Bei den schnellen Reaktionen macht man das einfach so, daß man die polarographische Walze laufen läßt und kontinuierlich den Diffusionsstrom registriert. So erhält man direkt Kurven, die den Verlust an Phthalyl verzeichnen (Abb. 3). Bei den Phthalyl-aminosäuren ist die Reaktion erster Ordnung auf Phthalylderivat, und erster Ordnung auf Hydroxylionen. In der Tabelle I sind einige Konstanten für diese Reaktion zweiter Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstante fällt von Glycin über Alanin zu Valin ab und bleibt dann ziemlich gleich. Das ist im großen ganzen, was man auf Grund sterischer Hinderung der Reaktion erwarten würde. Wenn man den Zerfall der Ester verfolgt (Tab. III), findet man, daß da die Reaktion noch schneller vor sich geht. Dadurch ist bewiesen, daß hier die Phthalylgruppe des Esters selbst gespalten wird und nicht die der Aminosäure nach Hydrolyse der Estergruppe. Bei den Peptiden haben wir keine so reine Kinetik gefunden, wie bei den Aminosäurederivaten und wir haben hier statt Geschwindigkeitskonstanzen Halbzeiten angegeben (Tab. II). Bei einem pH etwa 10, das wohl das geringste ist, bei dem man Ester verseifen könnte, haben die

meisten Phthalyl-derivate unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von nur einigen Minuten. Da nun die Reaktion erster Ordnung auf Hydroxylionen ist, und die Esterverseifung auch, kann man voraussetzen, daß sich das Verhältniss der zwei Reaktionen mit pH nicht markant ändern wird. Im allgemeinen Fall besteht also nicht viel Hoffnung, daß man Ester neben der Phthalylgruppe in präparativ nützlichen Ausbeuten verseifen könnte, es sei denn man fände solche Bedingungen, die die Spaltung der Imidgruppe stark inhibieren, nicht aber die der Estergruppe, z. B. durch Lösungsmittelleffekt.

BRENNER: Hat hier jemand Erfahrung mit der Methode von Kollonitsch zur Abspaltung des Phenylthiocarbonylrestes mit Persäuren?

WÜNSCH: Die beste Methodik ist die mit wäßriger Peressigsäure in Tetrahydrofuran. Wir konnten im Gegensatz zu Kollonitsch auch beim Arbeiten in indifferenten Lösungsmitteln, z. B. mit Perbenzoesäure, keine Spaltung der Peptidbindungen beobachten. Das hängt wohl damit zusammen, daß wir nicht das gleiche Versuchsmaterial hatten. Ich weise immer wieder darauf hin, daß vielleicht die Konfiguration der aufeinanderfolgenden Aminosäuren maßgebend ist für eine Spaltung.

BRENNER: Aber die Spaltung erfolgt?

WÜNSCH: Die Spaltung verläuft einwandfrei, am besten mit 5 bis 6 Mol Persäure für 2 Mol Thiourethan.

WIELAND: Die ideale Schutzgruppe wäre ja das Salz der Carbaminsäure — die wäre leicht einzuführen und leicht abzuspalten.

WÜNSCH: Tributylaminsalze von Carbaminsäuren würden sich doch sicherlich in Tetrahydrofuran lösen. Wenn man dann die Umsetzung mit amino-aktivierten Komponenten durchführt, also mit Phosphorazoverbindungen, Isocyanaten, Phosphat- oder Phosphitamid- oder dergleichen, dann brauchte man nachher nur anzusäuern und man bekäme den Peptidester.

WIELAND: Es ist nur nicht so einfach, solche Salze der Carbaminsäuren herzustellen. Aus den Leuchs'schen Körpern ginge es, das hat Bailey schon einmal ausgenützt [J. Chem. Soc. 1950, 3461]. Aber aus einer Aminosäure in einem unpolaren Lösungsmittel in Gegenwart einer Base durch Einleiten von Kohlendioxyd — das haben wir versucht, aber es ist uns leider nicht gelungen. Ich wollte einmal fragen, ob jemand von Ihnen auch solche Versuche angestellt hat.

BRENNER: Ja, ich kann etwas dazu sagen. Es ist zwar nicht von unmittelbarem Nutzen, regt aber vielleicht eine Idee an. Im Zusammenhang mit Versuchen über die Isomerisierung von Di-peptidamiden durch Aminoacyl-Einlagerung haben wir bemerkt, daß die Carbaminsäuren in flüssigem Ammoniak in Form der Natriumsalze außerordentlich beständig sind. Wenn man z. B. ein Carbobenzoxy-dipeptid-amid mit Natrium in flüssigem Ammoniak decarbobenzoxyliert, dann bekommt man die Carbaminsäure in der Form ihres Natriumsalzes, und das ist nun beständig, denn die Isomerisierung durch Aminoacyl-Einlagerung bleibt aus. Dies ist eine wichtige Beobachtung, und wir haben uns schon überlegt, ob man nicht davon Gebrauch machen könnte, um mit Hilfe der N-Carboxyanhydride Peptidsynthesen zu machen. Aber Ammoniak als Lösungsmittel ist natürlich ein so wirksamer Konkurrent der Amin-Komponente, daß das nicht gegangen ist. Aber die Beständigkeit der Natriumcarbaminat- in flüssigem Ammoniak ist eine Tatsache.

WIELAND: Und wenn Sie das Ammoniak abdampfen, dann ist auch das Salz zerfallen, ja?

BRENNER: Zumindest beim Ansäuern geht es kaputt. Aber gelöst ist es offenbar beständig.

WIELAND: Sie könnten es doch abdampfen und dann den Rückstand in einem anderen geeigneten Lösungsmittel aufnehmen.

WÜNSCH: Wenn man dann zu dieser Lösung in Ammoniak ein Tributylammoniumsalz, z. B. Tributylamin-hydrochlorid dazugibt, dann müßte sich ja Natriumchlorid bilden, wegen der größeren Affinität von Natrium für Chlor, und man würde dann die Tributylammoniumsalze der N-Carbonsäuren bekommen; und wenn man das Ammoniak dann verdampft — vielleicht könnte man es so weit bringen.

BRENNER: Aber die Tributylammoniumsalze sind, wie schon Bailey gezeigt hat, nicht beständig.

WÜNSCH: Wenn man das bei sehr tiefen Temperaturen macht?

BRENNER: Als eine Methode ist das eigentlich nicht brauchbar, wegen der Unbeständigkeit des Salzes.

WÜNSCH: Vielleicht läßt es sich doch erzielen, wenn man das Ammoniak bei ganz tiefer Temperatur wegdampft — man kann ja das Ammoniumsalz dann sofort wieder weiterverwenden.

BRENNER: Das muß man eben probieren.

WÜNSCH: Für Amide müßte das eventuell gehen. Man gibt Carbodiimid dazu; da müßte das verbliebene Ammoniak sofort mit dem O-Acylharnstoff reagieren und Amide geben.

## Diskussion

**TASCHNER:** Das Bromwasserstoff-Eisessig-Gemisch kann die Carbobenzoxygruppe, die Benzylestergruppe, Alkylestergruppen und auch Peptidbindungen spalten, wobei die Spaltungsgeschwindigkeit in der oben angegebenen Reihenfolge abnimmt. Die Carbobenzoxygruppe wird durch Bromwasserstoff solvolytisch gespalten, die Benzylestergruppe sowohl durch Bromwasserstoff wie auch durch die Essigsäure, wobei der Bromwasserstoff als Protonendonator fungiert. Auf die letztgenannte Weise werden auch Alkylester und Peptidbindungen gespalten.

Bei der Spaltung der Carbobenzoxygruppe in Carbobenzoxypeptid-benzyl- oder -alkylestern wird der Benzylester oftmals teilweise angegriffen, in manchen Fällen auch die Alkylestergruppierung [Taschner E., Kupryszewski G., Liberek B.: *Roczniki Chem.* 30, 643 (1956)], so daß man manchmal nachesterifizieren muß [Brunn-Leube I., Schramm G.: *Chem. Ber.* 89, 2045 (1956)]. Peptidbindungen werden im allgemeinen erst bei erhöhter Temperatur (100°) und längerer Einwirkungsdauer angegriffen, doch fanden wir, daß z. B. Benzoyl- und Acetyl-leucyl-glycin bereits bei Raumtemperatur gespalten wurden.

Wenn man die Carbobenzoxy- und die Alkylestergruppe gleichzeitig eliminieren will, so kann man das in einem Schritt erreichen indem man die Carbobenzoxygruppe wie üblich mit Bromwasserstoff-Eisessig abspaltet, darauf etwas Wasser zugibt und bei Zimmertemperatur einige Tage stehen läßt, oder auch einige Stunden auf 50° erwärmt. Im letzten Falle können manche Peptidbindungen in Mitleidenschaft gezogen werden. Will man aber in Carbobenzoxypeptid-alkylestern die Carbobenzoxygruppe selektiv abspalten, so ist es vielleicht vorteilhafter, die Reaktion nicht in Eisessig, sondern in inerten Lösungsmitteln und unter wasserfreien Bedingungen durchzuführen.

**RUDINGER:** Frl. Yang Chen-shu hat in unserem Laboratorium den folgenden Versuch mit Carbobenzoxy-leucyl-glycyl-glycin-äthylester gemacht: Die Carbobenzoxygruppe konnte mit konzentriertem Bromwasserstoff in Eisessig innerhalb einiger Minuten vollkommen entfernt werden; das freie Peptid, ohne Estergruppe, zeigt sich aber auf dem Chromatogramm erst nach einigen Stunden, und zur vollkommenen Spaltung beider Gruppen braucht es nach dem Chromatogramm mehr als 10 Tage bei Raumtemperatur; eine Spaltung der Peptidbindung ist dabei nicht beobachtet worden. Diese Bedingungen sind also bei Äthylestern ganz genügend selektiv; mit Benzylestern ist das ein andere Frage.

**TASCHNER:** Im Laufe einer anderen Arbeit haben wir die Beobachtung gemacht, daß wasserfreie Toluolsulfonsäure, in Eisessig gelöst, die Carbobenzoxygruppe spaltet ohne Estergruppen merklich anzugreifen.

### Tabelle

Spaltung der Carbobenzoxygruppe mit Toluolsulfonsäure; Verlängerung der Peptidkette von dem Aminó-Ende

Das durch Spaltung der Carbobenzoxygruppe unter den im Text angeführten Bedingungen erhaltene Toluolsulfonsäuresalz wurde im Überschuß mit Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester zur Reaktion gebracht.

Ausgangsstoff <sup>a</sup>	Toluolsulfonsäuresalz		Endprodukt <sup>a</sup>		
	Smp., °C	Ausb., %	Formel	Smp., °C	Ausb., %
Cbz-PheNHC <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	158—159	98	Cbz-Gly-PheNHC <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	188—189	93
Cbz-PheOEt	137—139	95	Cbz-Gly-PheOEt		74
Cbz-Phe-GlyOEt	178—179	98	Cbz-Gly-Phe-GlyOEt	129—131	44
Cbz-Gly-PheOEt	b	b	Cbz-Gly-Gly-PheOEt	100—101	84
Cbz-Gly-LeuOEt	b	b	Cbz-Gly-Gly-LeuOEt	121—122	70
Cbz-Leu-GlyOEt	b	b	Cbz-Gly-Leu-GlyOH <sup>c</sup>	156—157 <sup>c</sup>	51 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Phenylalanin und Leucin durchwegs in der DL-Konfiguration. <sup>b</sup> Öl, ohne Isolierung weiterverarbeitet. <sup>c</sup> Der nichtkristalline Ester wurde direkt alkalisch verseift.

Weitere Versuche (mit B. Liberek) wurden zunächst mit Toluolsulfonsäure in Eisessig, dann aber in neutralen Lösungsmitteln durchgeführt, um einer eventuellen acetolytischen Spaltung der Estergruppe vorzubeugen. Die Reaktion wird nun so durchgeführt, daß man den Carbobenzoxy-aminosäure- oder -peptidester (1 Mol) in wenig Toluol oder Benzol mit wasserfreier Toluolsulfonsäure (2,5 Mol) bis zum Aufhören der Kohlendioxid-Entwicklung (4 bis 20 Minuten) auf dem Wasserbade auf 50—90° erwärmt. Dann wird das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand

mit absolutem Äther gewaschen; die kristallinisch oder ölig anfallenden Toluolsulfonsäuresalze können ohne weitere Reinigung zur Verlängerung der Kette angewandt werden. Das Salz wird dabei in einem geeigneten Lösungsmittel mit einem tertiären Amin versetzt und mit einer aktivierten, N-geschützten Aminosäure gekuppelt (s. Tabelle).

Während der Spaltung der Carbobenzyoxygruppe bleibt die Äthylestergruppe vollständig intakt, auch wenn das Reaktionsgemisch eine Stunde lang zum Sieden erhitzt wird; dagegen ist die Benzylestergruppe unter diesen Reaktionsbedingungen nicht beständig.

Es wurde auch versucht, die Carbobenzyoxygruppe von Carbobenzyoxy-phenylalanin-cyanmethylester nach dieser Methode zu entfernen, wobei die Ausbeuten 70% nicht überstiegen. Das Toluolsulfonsäuresalz des Cyanmethylesters gab, mit tertiärem Amin versetzt, das entsprechende Diketopiperazin in recht guter Ausbeute.

RUDINGER: We have also examined the action of hydrogen bromide in glacial acetic acid on peptide derivatives in a somewhat different connection, and our results may perhaps be of interest here. As you will know, Emil Fischer introduced the use of hydrogen iodide-phosphonium iodide for the fission of arylsulphonyl groups, and Schönheimer applied this method to the preparation of some simple peptides. Later du Vigneaud and Behrens introduced reduction with sodium and liquid ammonia for the same purpose. With this method, the separation of the product from the large amount of inorganic material formed has frequently presented difficulties. A general working-up procedure using ion exchange resins was developed in our laboratories [Rudinger J.: This Journal 19, 375 (1954)] and independently by Swan and du Vigneaud [J. Am. Chem. Soc. 76, 1310 (1954)]. Recently we have been interested in developing a larger-scale synthesis of L-glutamine from L-glutamic acid through tosylpyroglutamic acid and tosyl-L-glutamine; and although the first stages here can easily be carried out on a scale of several kilogrammes, the detosylation with sodium and particularly the working up of this reaction are somewhat difficult on such a scale. About the time we were faced with this problem, Weisblat, Magerlein and Myers [J. Am. Chem. Soc. 75, 3630 (1953)] described a procedure for the fission of certain sulphonamides with hydrogen bromide in glacial acetic acid, in the presence of phenol as bromine scavenger, with a reaction time of several hours or days at room temperature. This procedure seemed promising to us, and we tested its applicability to the preparation of glutamine. We found that free glutamine is readily obtained from its tosyl derivative by treatment with hydrogen bromide in glacial acetic acid for about 2½ hours at 70°, 20 hours at 37°, or some 10 days at 20°, with yields of about 80%. The glutamine hydrobromide crystallises from the reaction mixture. Glutamine can be obtained from the hydrobromide by ion exchange, or by precipitation with methanol after neutralisation with ammonia. There is no appreciable fission of the amide group under any of these conditions.

We were, of course, interested to find out the scope of this reaction. We have used it preparatively in a number of cases which are summarised in Table I; in a number of others we have only examined the product chromatographically. In no case did we encounter any acetylated product,

Table I  
Removal of Tosyl Protecting Groups with Hydrogen Bromide in Glacial Acetic Acid

Amino-acids <sup>a</sup>			Peptides <sup>a</sup>		
Tosyl derivative	Method <sup>b</sup>	Yield, %	Tosyl derivative	Method	Yield, %
Tos-Glu(NH <sub>2</sub> )OH	A, B, C	78–82	Tos-Gly-GlyOH	B	50
Tos-Dab(NPhth)OH	A	75 <sup>c</sup>	Tos-Gly-Dap(NHTos)OH	A	66
Tos-DabOH	A	80	Tos-γ-But-GlyOH	A	88
Tos-Dab[NH.C:(NH)NH <sub>2</sub> ]OH	B	32	Tos-Gly-Dab(NPhth)-GlyOBz	A	70 <sup>c,d</sup>
Tos-OrnOH	A	75	Tos-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )OH	C	53
Tos-ArgOH	A	68	Tos-Glu(GlyOH)OH	B	87
Tos-ProOH	A	67	Tos-Glu(NH <sub>2</sub> )-GlyOH	B	75
H-Dap(NHTos)OH	A	84	Tos-Glu(GlyOEt)OH	B	72 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Dab is a residue of α,γ-diaminobutyric acid, Dap of α,γ-diaminopropionic acid, γ-But of γ-aminobutyric acid; the ω-functions, where substituted, are shown in parentheses after the symbol of the amino-acid. All asymmetric amino-acids except for diaminopropionic acid are of the L configuration. <sup>b</sup> A 65–70°, 2–5 hours; B 37°, 20–24 hours; C 20–22°, 10 days. <sup>c</sup> The phthaloyl group remains unattacked. <sup>d</sup> The ester group is cleaved.

Diskussion

and with procedures B and C, that is, at 37° or 20°, no fission of peptide bonds was observed; at 70°, there is slight fission of peptide bonds. Esters are cleaved under these conditions, but phthalyl groups and apparently also S-benzyl groups are stable. As I have already mentioned earlier in the discussion compounds with a free carboxyl  $\gamma$  to a tosylamino group undergo cyclisation to derivatives of the type *I* or *II* under these conditions; examples of this reaction are collected in Table II.



Finally, I should mention a practical point: Among the products of the reaction there are some which can cause unpleasant skin rashes, so that the use of rubber gloves is advisable.

Table II

Cyclisations of  $\gamma$ -Tosylamino-carboxylic Acids by Hydrogen Bromide in Glacial Acetic Acid

Starting material <sup>a</sup>	Conditions <sup>a</sup>	Product <sup>a</sup>	Yield, %
Tos-GluNH <sub>2</sub>	B	Tos- $\pi$ -GluNH <sub>2</sub>	74
Tos-Glu-GlyOH	B	Tos- $\pi$ -Glu-GlyOH	68
H-Dab(NHTos)OH	A	HBr.H- $\pi$ -Dab(Tos)	80
Tos-Dab(NHTos)OH	A	HBr.H- $\pi$ -Dab(Tos)	96
Tos- $\pi$ -Dab(Tos)	A	HBr.H- $\pi$ -Dab(Tos)	86

<sup>a</sup> Symbols as in Table I; Tos- $\pi$ -Glu- is 1-tosylpyrrolid-5-one- $\pi$ -2-carbonyl-(tosyl-pyrroglutamyl, *I*), - $\pi$ -Dab(Tos), by analogy, amino-substituted 1-tosyl- $\pi$ -3-aminopyrrolid-2-one (*II*).

BRENNER: Ich möchte mir noch eine Bemerkung erlauben zu dem, was Herr Dr. Wünsch über jene unliebsamen Fälle gesagt hat, wo Natriumsalze von Carbobenzoxyverbindungen an Stelle der freien Säuren isoliert worden sind. Herr Wünsch hat das darauf zurückgeführt, daß die Carboxylgruppe vielleicht allzu stark maskiert sei und daß deshalb die Zerlegung des Salzes auf Schwierigkeiten stoße. Ich glaube nicht, daß diese Erklärung zutreffend ist. Wir dürfen nicht vergessen, daß Acylaminosäuren relativ starke Säuren sind — das wird im allgemeinen viel zu wenig beachtet — und daß man stark ansäuern muß, wenn man sie wirklich vollständig in der undissoziierten Form haben will. Andererseits ist es eine alte Beobachtung, daß Carbonsäuren mit großen Fettresten beim Ausschütteln im Scheidetrichter die Tendenz haben, in Form ihrer Salze in die organische Phase zu gehen. Es ist ja oft nicht einmal möglich, eine Carbobenzoxyverbindung mit Bicarbonat auszuschütteln, sie geht einfach nicht in die wäßrige Phase. Es ist dann so, daß wir bei einem pH, das nicht genügend tief ist, eine Mischung von freier Säure und Natriumsalz haben und wenn wir die wäßrige Lösung mit Essigester schütteln, geht eben beides in die Essigester-phase.

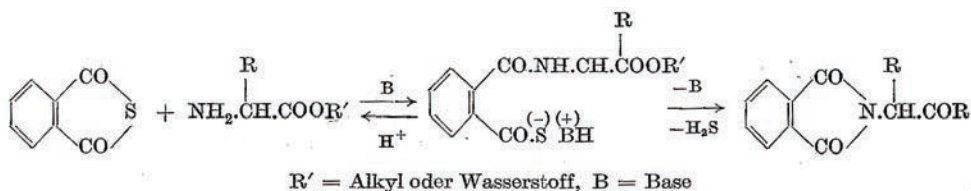
WÜNSCH: Ich habe in chromatographischen Studien festgestellt, daß dies nur bei solchen Carbobenzoxyverbindungen auftritt, die eine verhältnismäßig schwache Dissoziationskonstante haben. Den Unterschied kann man durch Anfärbung von Carbobenzoxyaminosäuren auf dem Chromatogramm mit Kaliumjodid-Jodat-Stärke feststellen. Bei Carbobenzoxy-phenylalanin oder Dicarbobenzoxy-lysin tritt die Färbung bedeutend später ein als z. B. beim Carbobenzoxy-glycin usw. Im Falle des Carbobenzoxy-phenylalanins, das ja Bergmann und Mitarbeiter mit Smp. 126—128°, und dann Vaughan noch einmal mit Smp. 130° beschreiben, ist es mir gelungen, aus diesem Gemisch durch Aufnehmen in siedendem Essigester und Abwarten der Kristallisation ein Produkt zu isolieren, dessen Schmelzpunkt, 143—144°, sich durch Umkristallisieren nicht weiter steigern läßt. Es hatte eine Zusammensetzung von einem Atom Natrium

auf 5 Mol Carbobenzoxy-phenylalanin. Wir neigen dazu, die Verbindung fast als Einschlußverbindung oder dgl. zu bezeichnen. Es ist eine einheitliche Verbindung, die sich in heißem Essigester löst und daraus mit demselben Schmelzpunkt ausfällt. Wenn solche Aminosäuren, deren Carbobenzoxyderivate eine geringere Dissoziationskonstante als Carbobenzoxy-glycin oder -alanin haben, am Ende als Ester stehen — also Carbobenzoxytripeptidester mit Phenylalanin,  $\epsilon$ -Carbobenzoxylysin oder z. B. auch Valin — dann wird neben der Esterspaltung auch der Carbobenzoxyrest angegriffen, und zwar um so stärker, je geringer die Dissoziationskonstante der Carbobenzoxyaminosäure nach dieser Methode ist. Es liegt durchaus nahe, daß auf der einen Seite der große verzweigte Rest (bei Phenylalanin der Phenylring), auf der anderen Seite die große Carbobenzoxygruppe, die ja eindeutig in *cis*-Stellung zur Carboxylgruppe steht (dadurch die leichte Spaltung von Carbobenzoxyaminosäurechloriden zu Oxazoliddionen) aus sterischen Gründen zur Maskierung der Carboxylgruppe entscheidend beiträgt.

BRENNER: Haben Sie pK-Werte von Carbobenzoxy-glycin usw. gemessen? Einige diesbezügliche Daten finden sich bei Cohn und Edsall [*Amino Acids, Peptides and Proteins as Ions and Dipolar Ions*. Reinhold, New York 1943].

WÜNSCH: Nein, die haben wir nicht gemessen. Ich bin dazu im Moment nicht eingerichtet; aber es wäre wünschenswert das einmal zu tun.

ZAORAL: Vor einiger Zeit studierten wir die Reaktion des Thiophthalsäureanhydrids mit Aminosäuren und deren Estern, da diese Reaktion die Möglichkeit bot, die synthetisch nützlichen Phthalylaminosäuren und Phthalylaminosäureester auf diesem Wege darzustellen. Es zeigte sich, daß das Thiophthalsäureanhydrid mit Aminosäureestern in Chloroform- oder Ätherlösung in Gegenwart von 1 Mol einer tertiären Base (am besten N-Äthylpiperidin) orangegefärbte kristallinische oder ölige wasserlösliche Salze bildet. Durch Ansäuern der wäßrigen Lösung dieser Salze zersetzen sie sich unter Entstehung von Thiophthalsäureanhydrid und der entsprechenden Salze des Aminosäureesters.



Die Salze ließen sich glatt cyclisieren, entweder durch längeres Stehen der wäßrigen Lösung bei Zimmertemperatur, oder schneller durch Erwärmen oder durch Einwirkung von Wasserstoffperoxyd. Schnell verlief auch die Cyclisierung der Salze in einem geeigneten Lösungsmittel

Tabelle I

Herstellung von Phthalylaminosäureestern mittels Thiophthalanhydrid

Ester	Methode	Ausb., %
Phth-GlyOEt	A	97
	B	88
	C	81
	D	90
	F	79
Phth-DL-AlaOEt	B	80
	F	76
Phth-DL-ValOEt	B	67*
Phth-L-LeuOMe	B	76*
Phth-L-LeuOEt	A	74*
	B	70*
	D	78*

\* Nichtkristallin; siehe Text.

Tabelle II

Herstellung von Phthalylaminosäuren mittels Thiophthalanhydrid

Aminosäure <sup>a</sup>	Base	Ausb., %
Phth-GlyOH	NaHCO <sub>3</sub>	67
	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N.Et	60
Phth-AlaOH	NaHCO <sub>3</sub>	18
	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N.Et	39
Phth-NvalOH	NaHCO <sub>3</sub>	25
	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N.Et	43
Phth-ValOH	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N.Et	33
Phth- $\gamma$ -Aminobuttersäure	NaHCO <sub>3</sub>	35
Phth- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure	NaHCO <sub>3</sub>	46

<sup>a</sup> DL-Konfiguration.

## Diskussion

durch Diazomethan. Im präparativen Maßstabe bedienen wir uns der Cyclisierung durch Erwärmen. Dabei zeigte es sich, daß die Geschwindigkeit der Cyclisierung mit anwachsender Größe der Aminosäureseitenkette absank. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle I ersichtlich. Die Ausbeuten sind dabei auf reine Stoffe bezogen. Die mit einem Asterick bezeichneten Daten beziehen sich auf nichtkristallinische Produkte, aber auch diese mußten bereits beträchtlich rein sein, da sie durch Säurehydrolyse die betreffenden Phthalimidosäuren in guter Ausbeute ergaben.

Die Reaktion von Thiophthalsäureanhydrid mit Aminosäuren wurde in wäßrigem Tetrahydrofuran in Anwesenheit von 2 Mol Natriumhydrogencarbonat durchgeführt. Die Reaktion verläuft wahrscheinlich auch in diesem Falle in zwei Stufen, indem sich zuerst relativ rasch das Salz der entsprechenden *o*-Thiocarboxybenzoylaminosäure bildet, das dann langsamer zu dem Phthalimidosäurederivat cyclisiert. Die zweite Stufe verläuft leider mit Aminosäuren nicht so glatt wie mit deren Estern. Die Ausbeuten an Phthalimidoderivaten waren mit Ausnahme von Glycin und den  $\omega$ -Aminosäuren gering und sanken weiter mit wachsender Größe der Aminosäureseitenkette. Die Anwendung von *N*-Äthylpiperidin anstatt Bicarbonat führte in einigen Versuchen zu höheren Ausbeuten an Phthalimidosäure (Tabelle II).

Wird die Reaktion in kochendem Pyridin durchgeführt, erhält man direkt die Phthalimidosäuren in guter Ausbeute. Bei den einfachen neutralen Aminosäuren führte die Reaktion zu optisch reinen Produkten, aus polyfunktionellen Aminosäuren (Glutaminsäure oder *S*-Benzylcystein) wurden jedoch fast völlig racemisierte Produkte erhalten.

Wie schon angeführt wurde, verläuft die Reaktion des Thiophthalsäureanhydrides mit Aminosäuren in wäßriger Lösung in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat nur bei Glycin und  $\omega$ -Aminosäuren befriedigend. Wir haben einen Versuch gemacht, diesen Unterschied in der Reaktivität zur selektiven Phthalylierung der  $\omega$ -ständigen Aminogruppen einiger basischer Aminosäuren auszunützen. Dabei stellten wir fest, daß eine solche Reaktion bei  $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure, Ornithin und Lysin wirklich durchführbar ist, daß sie aber bei  $\alpha,\beta$ -Diaminopropionsäure zu einem untrennbaren Gemisch von monophthalylierten Derivaten führt.

VAJDA: Ich möchte einige mit der Carbobenzyloxy-Schutzgruppe zusammenhängenden Erfahrungen erwähnen. Wir haben freie Asparaginsäure bei Einwirkung von Phosgen und nachher durch Hitze polymerisation in Polyasparaginsäuren gemischten Bindungstyps umgewandelt. Auf ähnliche Weise versuchten wir die Polyasparaginsäure aus *N*-Carbobenzyloxyasparaginsäure nach der Leuchs'schen Methode herzustellen. Wir erwarteten, daß sich die isomeren Säurechloride unter Abspaltung von Benzylchlorid und dann gleich unter Kohlendioxyd-Abspaltung in die Polysäure gemischten Bindungstyps umgewandelt würden. Aber wir konnten feststellen, daß dieses Produkt wider Erwarten nicht die freie Polysäure, sondern der Polybenzylester war. Zur theoretischen Deutung ließe sich eine Reaktionsmöglichkeit erwägen, die von Albertson und McKay [J. Am. Chem. Soc. 75, 5323 (1953)] aufgeworfen wurde, und die darauf beruht, daß bei der thermischen Zersetzung von *N*-Carbobenzyloxyaminosäuren unter Kohlendioxyd-Abspaltung als primäre Produkte die Benzylester entstehen könnten. Die Autoren haben den hypothetischen Benzylester nicht isoliert. Nun könnte man bei unserem Poly-asparaginsäurebenzylester annehmen, daß aus den Carbobenzyloxy-asparaginsäure-monochloriden die isomeren Chloride der Asparaginsäure monobenzyloster entstehen, die dann unter Chlorwasserstoff-Abspaltung eine zur Bildung der Polybenzylesters führende intermolekulare Polyacylierung erleiden. Wir konnten in der Tat feststellen, daß bei der Hitzebehandlung neben Kohlendioxyd auch reichlich Chlorwasserstoff entweicht. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß unter gewissen Bedingungen die Carbobenzyloxygruppe vom Amino- zum Carboxylrest wandern kann.

WÜNSCH: Dies würde praktisch der Abspaltung entsprechen, die Professor Taschner mit den Sulfonsäuren studiert hat, bzw. der Halogenwasserstoffsolyolyse. Faktisch übernimmt da eben bei der höheren Temperatur die Carbonsäure die Rolle des Halogenwasserstoffs. Ein Umschwenken des Benzylrestes auf die Carboxylgruppe könnte durchaus erfolgen; undenkbar ist das eigentlich nicht bei höherer Temperatur. Es handelt sich doch um höhere Temperaturen, nicht?

VAJDA: Ungefähr 110–120°.

WÜNSCH: Über dem Schmelzpunkt?

VAJDA: Ungefähr bei dem Schmelzpunkt.

BRENNER: Ich glaube, der Azidorest verdient es auch ein wenig genauer als Aminoschutzgruppe betrachtet zu werden. Herr Wieland hat ja gesagt, daß er bei der Herstellung der Diacylimide den Azidorest in guter Ausbeute mit Hilfe von Bromwasserstoff in Eisessig in die Aminogruppe überführen konnte. Wir haben dieselbe Erfahrung auch in unserem Laboratorium gemacht, er ist übrigens auch sehr leicht durch Hydrierung in die Aminogruppe überzuführen und Azidofettsäuren sind ihrerseits aus den Halogenfettsäuren leicht zugänglich. Man steht allerdings noch vor der Aufgabe der Racematspaltung; aber eine optisch aktive Azidofettsäure zu machen

### *Amino-Schutzgruppen*

und endständig in eine Peptidkette einzuführen wird sich bestimmt in solchen Fällen lohnen, wo Schwierigkeiten mit der Aminoschutzgruppe auftreten, wenn man die bekannten Verfahren verwenden will.

RUDINGER: Wir haben mit Herrn Zaoral auch über diese Frage nachgedacht. Es gibt da theoretisch noch eine andere Möglichkeit und das wäre die Aminogruppe von einer Aminosäure in die Azidogruppe überzuführen, ohne zu racemisieren. Wenn das in einigermaßen guter Ausbeute durchführbar wäre, könnte die Azidogruppe zu einer der wichtigsten Schutzgruppen werden.

BRENNER: Ja, aber auch das Problem der totalsynthetischen Herstellung von Azidofettsäuren ist sehr aktuell.

RUDINGER: Eher die Racematspaltung! Vielleicht könnte man das enzymisch machen?

BRENNER: Ich glaube, da muß sich jede klassische Methode verwenden lassen. Wir haben uns ein wenig mit Racematspaltungen beschäftigt, und das geht erstaunlich gut mit den klassischen Methoden. Dazu kommt, daß man wahrscheinlich die „falsche“ Form, also die *D*-Form in diesem Fall, relativ leicht wird racemisieren können, so daß man an sich keine Verluste hätte.

## CARBOXYL-SCHUTZGRUPPEN

E. TASCHNER

*Institut für organische Chemie, Technische Hochschule, Gdańsk*

Das Manuskript des Vortrages von Prof. E. Taschner lag leider nicht im Termin vor und von seiner Veröffentlichung mußte darum Abstand genommen werden.

*Die Redaktion.*

### Diskussion

zu dem Referat von E. TASCHNER

BRENNER: Die Diazometholyse — Esterspaltung mit Diazomethan — ist eine sehr interessante Reaktion. Sie haben auch etwas in dieser Richtung gemacht, Herr Wieland?

WIELAND: Wir haben bei Lactonen beobachtet, daß sie in äthylalkoholischer Lösung dann sehr leicht unter Veresterung mit Äthylalkohol aufgespalten werden, wenn Diazomethan dazu kommt [Wieland T., Ohnacker G., Rothhaupt R. K.: Chem. Ber. 88, 633 (1955)]. Es bildet sich dabei nicht der Methyl ester, sondern der Äthylester. Daraus ist zu schließen, daß das Diazomethan einen Katalysator darstellt. Es ist eine Umesterung, keine Verseifung. Zur gleichen Zeit hat Bredereck [Bredereck H., Sieber R., Kamphenkel L.: Chem. Ber. 89, 1169 (1956)] eine Arbeit veröffentlicht, in der er diese Beobachtung auch auf Ester ausdehnt. Man kann also zum Beispiel einen Methyl ester zu dem Äthylester umestern in Gegenwart von Diazomethan. Aber es ist keine Verseifung, das möchte ich hier nochmals betonen. Es würde das Problem der Abspaltung des Esters, also der Verseifung, vielleicht dadurch fördern, daß man den Methylalkohol mit einem anderen Alkohol umestern könnte so daß ein Ester entsteht der jetzt leicht hydrolytisch zu spalten wäre.

BRENNER: Die Diazometholyse von Baer und Maurukas ist eine wirkliche Spaltung. Es ist eine merkwürdige Reaktion, auf die ich in meinem Referat zurückkommen werde.\*

WIELAND: Es ist aber auch eine Spaltung unter Esterbildung, nicht? Die Phosphatidsäure wird nachher als Ester erhalten.

BRENNER: Ja. Es ist aber kein Alkohol im Reaktionsgemisch und die Aminogruppe ist notwendig, sonst geht es nicht.

WIELAND: Vielleicht kann man sich jetzt einmal kurz Gedanken machen über den Mechanismus der Veresterung in Gegenwart von Phosgen. Wir haben gestern einmal diese Frage angeschnitten. Sie hatten gedacht, daß dabei ein gemischtes Anhydrid entsteht. Vielleicht möchten Sie ein paar Worte darüber sagen, Herr Brenner?

BRENNER: Wenn man irgendeine Verbindung, die eine aliphatische oder aromatische Hydroxylgruppe enthält, etwa mit einer Carbobenzoxycarbonsäure verestern will, dann kann man daran denken, diese Carbobenzoxycarbonsäure nach dem Wieland-Boissonnas-Vaughan Verfahren zu aktivieren, indem man ein gemischtes Anhydrid mit Kohlensäure macht. Das ist auch in einigen Fällen mit Erfolg geschehen; in anderen Fällen hat man weniger Glück gehabt, und zwar deshalb, weil im Laufe der Reaktion aus dem gemischten Anhydrid  $R'CO.O.CO.OR$  ein Alkohol

\* S. 131.

ROH, z. B. Methylalkohol oder Äthylalkohol, frei wird und dann mit der zu veresternden OH-Verbindung in Konkurrenz tritt. Aus diesem Grunde haben wir gedacht, man könnte an Stelle von Alkylkohlensäurechloriden,  $\text{Cl.CO.OR}$ , die man zur Herstellung der gemischten Anhydride verwendet, mit  $\text{Cl.CO.Cl}$ , also mit Phosgen arbeiten. Es ist in der Tat so, daß man das Phosgen in Gegenwart einer tertiären Base, z. B. Triäthylamin, mit einer Säure,  $\text{R'.COOH}$ , bei  $-80^\circ$  umsetzen kann und dabei ein Zwischenprodukt bekommt, das auf Zusatz der Hydroxyl-Verbindung  $\text{R''OH}$  in sehr guter Ausbeute zum Ester  $\text{R'.COOR''}$  führt. Unsere Meinung war nun die, daß aus beiden Komponenten primär ein gemischtes Anhydrid  $\text{R'.CO.O.CO.Cl}$  gebildet werden könnte. Dieses kann dann mit dem Alkohol  $\text{R''OH}$  weiterreagieren, sei es unter direktem Abbau zu Kohlendioxyd und Esterbildung, oder unter intermediärer Bildung von einem gemischten Anhydrid  $\text{R'.CO.O.CO.OR''}$ , das dann beim Erwärmen  $\text{CO}_2$  verlieren würde. Wir glauben, daß solche Zwischenprodukte wirklich auftreten. Wenn man nämlich eine optisch aktive acylierte Aminosäure wie Benzoyl-L-leucin oder dgl. verwendet und mit einer Base wie Glycinester kuppelt, so beobachtet man vollständige Racemisierung. Das ist ein ziemlich guter Hinweis dafür, daß eine Anhydrid-Stufe durchschritten wird. Das Ganze ist eine Hypothese. Gewiss ist nur, daß die Methode sich präparativ gut anwenden läßt. Nachdem ich aber jetzt von Herrn Dr. Rothe gehört habe, daß man Ester auch mit Dicyclohexylcarbodiimid machen kann, so glaube ich, daß wir die Phosgen-Methode lieber nicht mehr gebrauchen und an ihrer Stelle mit Dicyclohexylcarbodiimid arbeiten wollen.

ROTHE: Also bei Salicylsäuren haben wir ausnahmsweise etwas geringere Ausbeuten bekommen, als Sie nach Ihrem Verfahren, aber auch noch 70–80%.

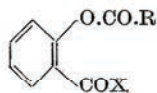
BRENNER: Da man von Salicylsäureestern spricht, möchte ich hierzu noch folgendes erwähnen: Man kann Salicylsäureester als aktivierte Ester auffassen. Verestert man z. B. den Benzylester von Salicylsäure am phenolischen Hydroxyl etwa mit Carbobenzoxy-glycin, dann ist dieses Carbobenzoxy-glycin aktiviert, ähnlich wie bei einem *p*-Nitrophenylester u. dgl. Diesen Ester kann man nun gut für Umesterungen gebrauchen. Setzt man ihn mit einem Alkohol, ROH, in Gegenwart von Triäthylamin um, so findet in der Wärme fast quantitativ Bildung von  $\text{CbzNH.CH}_2\text{COOR}$  statt. Als Lösungsmittel dient Dioxan oder so etwas. Ich kann die Methode sehr empfehlen.

RUDINGER: Das „R“ ist beliebig?

BRENNER: Wir haben  $\alpha$ -Benzyl-glycerinsäure verwendet und glatt den Ester  $\text{Cbz.NH.CH}_2\text{.CO.O.CH}_2\text{.CH(OC}_2\text{H}_5\text{).COOH}$  erhalten. Die intermediäre Bildung eines gemischten Anhydrids aus  $\alpha$ -Benzyl-glycerinsäure und Carbobenzoxy-glycin ist hierbei nicht ausgeschlossen. Der Ester könnte daraus durch intramolekulare Verschiebung des Acylrestes entstanden sein.

WIELAND: Haben Sie das auch mit tertiären Alkoholen versucht?

BRENNER: Wir haben es nicht versucht, haben aber unfreiwillig solche Experimente gemacht. Wir haben nämlich Verbindungen der Formel



die keine Aminoacyleinlagerung eingehen können, mit Kalium-*tert*-butylat in *tert*-Butanol behandelt; wir haben dabei *tert*-Butanol genommen in der Meinung, es würde keine Umesterung stattfinden. Diese Meinung war nicht ganz richtig — man kann aus solchen Salicylsäurederivaten und *tert*-Butanol in Gegenwart von Kalium-*tert*-butylat tatsächlich *tert*-Butylester bekommen. Die Ausbeuten kenne ich nicht, da wir die Umsetzung nicht hinreichend untersucht haben.

WIELAND: Vielleicht darf ich zum Mechanismus der Veresterung mit Phosgen noch eine Bemerkung äußern. Bei dem Zwischenprodukt, das Herr Brenner hier formuliert hat, besteht die Möglichkeit, daß der Alkohol sich mit dem Chlor zum gemischten Anhydrid umsetzt; man wird dann dasselbe erhalten, was man bekommt, wenn man ein Alkylkohlensäurechlorid mit der Säure umsetzt, also ein gemischtes Anhydrid. Nun sind diese gemischten Anhydride nach meiner Erfahrung nicht so empfindlich, daß sie unter  $0^\circ$  schon in Alkohol und Kohlendioxyd zerfallen, sondern man muß etwas höher gehen. Hier wäre eine Methode, wenn es gelänge, den Chlorameisensäure-*tert*-butylester leicht herzustellen. So müßte man die *tert*-Butylester der substituierten Aminosäuren gut bekommen. Ich glaube aber, daß der *tert*-Butylester der Chlorameisensäure recht schwer zugänglich ist. Phosgen mit *tert*-Butylalkohol gibt nicht in glatter Reaktion dieses Halbchlorid.

### Diskussion

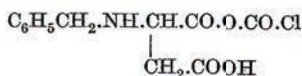
BRENNER: Es hat jemand ganz kürzlich solche *tert*-Butyloxyverbindungen hergestellt.

RUDINGER: Mit dem gemischten Carbonat, *p*-Nitrophenyl-*tert*-butylcarbonat. Sie haben auch *tert*-Butyloxy-carbonylchlorid hergestellt, aber das ist für praktische Zwecke nicht brauchbar. McKay und Albertson [J. Am. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)] haben Phenyl-*tert*-butylcarbonat gebraucht und haben die Methode nicht besonders gut gefunden. Anderson und McGregor [J. Am. Chem. Soc. 79, 6180 (1957)] haben den *p*-Nitrophenylester benützt, das ist mit freien Aminosäuren auch nicht gerade glänzend, aber mit Aminoestern etwas besser.

WIELAND: Diese *tert*-Butyloxy-carbonylverbindungen der Aminosäuren macht man ja aus den Isocyanaten, wie wir gestern gehört haben, und dem tertiären Alkohol. Das scheint jedenfalls ganz gut zu gehen.

Noch zum Phosgen-Mechanismus: die andere Möglichkeit ist natürlich die, daß der Alkohol mit dem Carboxylkohlenstoff des gemischten Chlorkohlensäureanhydrids reagiert. Es würde auch die Erklärung dafür in sich schließen, daß Racemisierung eintritt; denn dieses Zwischenprodukt kann mit dem Azlacton in Gleichgewicht stehen und trotzdem kann hier der Angriff erfolgen.

RUDINGER: Vielleicht ist es in diesem Zusammenhang interessant, daran zu erinnern, daß von der *N*-Benzylasparaginsäure ein Anhydrid ähnlicher Zusammensetzung isoliert worden ist [Liwschitz Y., Zilkha A.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3698 (1954)].



Das reagiert mit Aminen unter gewissen Bedingungen über das cyclische Anhydrid, aber es kann auch so reagieren, daß direkt an dem aktivierten Carboxyl eine Amidbindung entsteht. Man könnte vielleicht hier analog annehmen, daß sich mit dem Amin primär ein Carbaminsäureanhydrid bildet.

WÜNSCH: Der Mechanismus entspricht ja praktisch dem der Isocyanatmethode, das müßte schon gehen. Vor allem in Gegenwart von Basen müßte an und für sich dieses gemischte Anhydrid der Carbaminsäure mit der Carbonsäure rasch zerfallen. Naphthyl-Ester sind schon auf diesem Weg gemacht worden, die ja ansonsten sehr schlecht zugänglich sind; und zwar durch Umsetzung des Säure mit dem Kohlensäureester-chlorid des Naphthols. Man erhält zuerst das gemischte Anhydrid der Carbonsäure mit dem Kohlensäurehalbester, das dann unter Kohlendioxyd-Abspaltung zerfällt und den gewünschten Naphthylester liefert: Auf diese Art ist z. B. Carbo-benzoxy-leucin- $\beta$ -naphthylester synthetisiert worden.

WIELAND: Vielleicht darf ich noch auf etwas hinweisen: Wir haben von Herrn Taschner gehört, daß im Prinzip alle aktivierten Carboxylverbindungen zur Veresterung brauchbar sind. Da müssen wir natürlich wieder daran denken, daß hier die Racemisierungsfahr innewohnt und man wird dann schon solche Methoden benützen, bei denen die Racemisierung nicht zu befürchten ist. In dem Zusammenhang möchte ich doch noch einmal unsere Methode mit Phosphorochlorid empfehlen, wo ein Zwischenprodukt der Formel  $\text{AcNH.CH.R.CO.OP(O)Cl}_2$  entsteht. Dieses Anhydrid ist außerordentlich reaktiv und läßt sich natürlich auch mit Alkoholen umsetzen. In der Peptidchemie haben wir hier niemals Racemisierung beobachtet. Die ganze Reaktion geht bei  $-20^\circ$  vor sich und es wäre zu versuchen, ob man das nicht auf weitere Veresterungen ausdehnen könnte.

BRENNER: Haben Sie nicht so etwas in Gegenwart von Serin gemacht?

WIELAND: Ja, und da hat die Hydroxylgruppe nicht reagiert. Das kommt aber daher, weil die Konkurrenz der Aminokomponente, die im Ansatz mit dabei ist, zu groß ist, zu groß ist. Das OH reagiert natürlich viel langsamer, das ist bekannt, weil es weniger nucleophil ist und sobald Aminokomponenten dabei sind, reagieren diese sofort, dann kann nichts mehr passieren. Wenn man aber die Aminokomponente wegläßt und die Reaktion in Gegenwart des Alkohols vornimmt, könnte ich mir denken, daß man vielleicht zum Ziel kommt.

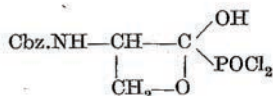
BRENNER: Ich möchte genauer fragen: Haben Sie auf diese Weise auch Carbo-benzoxy-serin aktiviert?

WIELAND: Ja, aber bei dieser Methode aktivieren wir ja in Gegenwart der Aminokomponente. Man gibt das Amin und die Säure in Pyridin zusammen und fügt dann die berechnete Menge von Phosphorochlorid zu und isoliert kurz danach das Peptid.

### Carboxyl-Schutzgruppen

BRENNER: Ich bin durchaus mit Ihnen einverstanden. Immerhin ist bei N-Acyl-serinen das aktivierte Carboxyl in Nachbarschaft des Hydroxyls. Letzteres wird dann als Konkurrent viel ernster zu nehmen sein, als wenn es nicht im gleichen Molekül wäre. Ich frage mich also, ob in diesem Fall eine Konkurrenz mit der Aminogruppe in anderen Molekülen möglich ist, weil die Hydroxylgruppe so viel bessere sterische Chancen bietet.

WIELAND: Sie meinen dieses Zwischenprodukt?



Dieses Zwischenprodukt wäre zu erwarten. Hier ist aber der Ringabstand zu ungünstig, hier müßte sich ein Vierring ausbilden, wenn ein interner Ester entstehen wollte. Es müßte hier ein  $\beta$ -Lacton entstehen. Dazu ist, glaube ich, die sterische Gegebenheit nicht da.

BRENNER: Ich meinte, das primäre Hydroxyl könnte am Phosphor angreifen.

WIELAND: Es greift wohl an der Carbonylgruppe der aktivierten Säure an. Hier greift es nucleophil an, und hier ist die Hydroxylgruppe natürlich in der Nachbarschaft. Es könnte vielleicht auch ein  $\beta$ -Lacton entstehen; das würde aber durch das Amin wieder zum Peptid aufgespalten werden. Das können wir nicht ausschließen.

WÜNSCH: Die Veresterung mit Thionylchlorid und Alkohol, bzw. mit Sulfiten oder Phosphiten, geht z. B. nicht im Falle des Nitroarginins. Unter diesen Bedingungen wird die Nitroguanidogruppe weitgehend reduziert.

Noch ein Wort zur Frage von Carboxylschutzgruppen. Ich habe schon gestern erwähnt, daß wir auch Thioester nicht nur als aktivierende Komponente, sondern auch als Carboxylschutzgruppe verwendet haben. In den Fällen, in denen sich Ester alkalisch schlecht verseifen lassen, könnte dieses Verfahren von Vorteil sein. Das wäre zunächst der gleiche Mechanismus, wie ihn Kollonitsch bei der Abspaltung des Phenylthiocarbonyl-Restes angenommen hat. Wir erhalten da (nach Kollonitsch) ein Zwischenprodukt, das ein gemischtes Anhydrid der Carbonsäure und einer Sulfonsäure bzw. Sulfinsäure ist; durch Hydrolyse erhält man schließlich das Carboxypeptid und (nach Kollonitsch) Sulfonsäure und Sulfinsäure. Wir konnten jedoch bei unseren Versuchen keine Sulfinsäure als Reaktionsprodukt feststellen, also muß der Mechanismus ein etwas anderer sein.

Die Ergebnisse unserer Versuchsreihen sind in Tabelle I und II wiedergegeben. Die maximalen Ausbeuten werden somit bei Anwendung von ca. 3 Äquivalenten Persäure erzielt; die Ausbeuten

Tabelle I

Spaltung von Carbobenzoxy-glycyl-glycin-thiophenylester  
Reaktionsablauf; Kontrolle mittels Kaliumjodid-Stärke-Reaktion.

Äquiv. Persäure	Reaktionsdauer (Stunden)				
	18	24	48	90	120
Peressigsäure					
1	- <sup>a</sup>				
2	- <sup>a</sup>				
2,5	+++	++	+	- <sup>a</sup>	
3	++++	+++	++	+	+ <sup>a</sup>
4	++++	++++	++++	+++	+++ <sup>a</sup>
Perbenzoesäure					
2,5	+++	+	- <sup>a</sup>		
3	++++	++	+ <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> Aufgearbeitet.

## Diskussion

sind beim Einsatz von Peressigsäure höher als bei Perbenzoesäure. Der zeitliche Verlauf liegt dagegen bei der Perbenzoesäurespaltung günstiger. Tetrahydrofuran als Lösungsmittel bewährte sich am besten.

Chromatogramme zeigen, daß keine Spaltung der Peptidbindungen stattfindet. So sind z. B. im Triglycin keinerlei Diglycin oder Glycin enthalten. Diese Methode der Entfernung einer Carboxylschutzgruppe, also eines Thioesters, durch oxydative Spaltung ist durchaus ohne Angriff auf die Peptidbindung möglich. Wie weit sich das auf andere Aminosäuren übertragen läßt, das wissen wir zur Zeit noch nicht, aber bei Glycin-Derivaten geht die Methode jedenfalls ganz glatt.

### Tabelle II

Spaltung von Carbobenzoxy-glycyl-glycin-thiophenylester  
Ausbeuten (%) an Carbobenzoxy-glycyl-glycin in Abhängigkeit von Persäureart, Persäuremenge und Lösungsmittel; Zeitabhängigkeit nach Tabelle I.

Lösungsmittel	Persäure	Äquivalent Persäure				
		1	2	2,5	3	4
Eisessig	Peressigsäure <sup>a</sup>	32	41	56,5	62	—
Tetrahydrofuran	Peressigsäure	—	—	71–73	78,5	78
97% Essigsäure	Perbenzoesäure	—	—	49	—	—
Eisessig	Perbenzoesäure	—	—	41	—	—
Tetrahydrofuran	Perbenzoesäure <sup>b</sup>	—	—	67	73	—

<sup>a</sup> Wasserstoffperoxyd in Essigsäure. <sup>b</sup> In Chloroform.

WIELAND: Darf ich vielleicht darauf hinweisen, daß die Abspaltung der Thioestergruppe auch mit Schwermetallsalzen gelingt, also mit Quecksilbersalzen, usw. Daher verdienen die Thioester vielleicht doch eine gewisse Beachtung, wenn es sich darum handelt, eine Estergruppe sehr milde abzuspalten.

TASCHNER: Die alkalische Hydrolyse der Estergruppe der Carbobenzoxy-peptide ist nicht immer selektiv, da die Carbobenzoxy-schutzgruppe oft mit angegriffen wird. Aus analogen Gründen scheint die saure Hydrolyse auch nicht immer anwendbar. Die acidolytische Spaltung der Estergruppen der Phthalyl- oder Tosyl-peptid-ester mit Bromwasserstoff-Eisessig läßt diese Aminoschutzgruppen unangegriffen [Taschner E., Küpryszewski G., Liberek B.: *Roczniki Chem.* 30, 643 (1956); *ibid.*, im Druck]; unter diesen Bedingungen wird dagegen die Carbobenzoxy-gruppe in Mitleidenschaft gezogen, so daß diese Methode zur Spaltung der Carbobenzoxy-peptid-ester nicht angewandt werden kann.

Nun schien es uns, daß man die letztgenannte Methode zu diesem Zweck modifizieren könnte. Diese Arbeiten wurden mit Herrn B. Liberek unternommen.

Bei der Acidolyse der Estergruppen ist die organische Säure der spaltende Agens — es entstehen ja die entsprechende Ester, wobei der Bromwasserstoff die Rolle eines Protonenspenders spielt. Bei der Spaltung der Carbobenzoxygruppe mit Bromwasserstoff-Eisessig ist es dagegen der Bromwasserstoff der angreift und die Essigsäure hat hier nur die Rolle eines Lösungsmittels. Die beiden Reaktionen verlaufen folglich nach zwei verschiedenen Mechanismen und es bestehen so Voraussetzungen, die es ermöglichen müßten, die Spaltung der einen Gruppe in Gegenwart der anderen durchzuführen.

Um die Estergruppe in Carbobenzoxy-peptid-estern selektiv spalten zu können, wurde zunächst daran gedacht die Konzentration des Bromwasserstoffs auf das Mindestmaß zu verringern. Es zeigte sich jedoch, daß auch dann die Spaltung der Carbobenzoxygruppe schneller verläuft als die der Estergruppe, da fast die ganze Menge des Bromwasserstoffs zur Spaltung der Carbobenzoxygruppe aufgebraucht wurde. Auch der Chlorwasserstoff, der ein ebenso wirksamer Katalysator wie der Bromwasserstoff ist, dabei aber mit der Carbobenzoxygruppe langsamer reagiert, zeigte sich für diesen Zweck unanwendbar.

Es entstand nun die Frage, einen Katalysator zu finden, der befähigt wäre, die acetolytische Spaltung zu katalysieren ohne aber die Carbobenzoxygruppe anzugreifen. Unter den verschiedenen Säuren, die geprüft wurden, erwies sich die Toluolsulfonsäure als die geeignetste.

Wenn die Reaktion in Eisessig mit wasserfreier Toluolsulfonsäure unter wasserfreien Bedin-

Carboxyl-Schutzgruppen

gungen durchgeführt wurde, fand keine Spaltung der Estergruppe statt, doch wurde die Carboxygruppe merklich angegriffen. In 96% wäßriger Essigsäure wurden dagegen Methyl-, Äthyl- und Benzylestergruppen der untersuchten Carboxyaminosäure- und -peptidester glatt gespalten, wobei die Carboxygruppe vollständig intakt blieb.

Die Reaktion wird so durchgeführt, daß 1 Millimol Ester und 2,5 Millimol Toluolsulfonsäure in ca. 2,5 Millimol 96% Essigsäure gelöst und 3 bis 4 Tage bei Zimmertemperatur belassen wurden.

Die Tatsache, daß diese Reaktion nur in Gegenwart kleiner Mengen Wasser vor sich geht, nicht aber in ihrer Abwesenheit, ließ vermuten, daß es sich hier vielleicht um eine Hydrolyse und nicht eine Acidolyse handelt. Diese Vermutung verstärkte sich, als es sich im Weiteren erwies, daß die Reaktion unter ansonsten gleichen Bedingungen auch in 80% Dioxan oder 80% Aceton in fast ebensoguter Ausbeute verläuft (Tab. I).

Tabelle I

Selektive Spaltung von Estergruppen von Carboxy- bzw. Tosyl-peptid-estern  
Mengenverhältnisse wie im Text erwähnt. Reaktionsdauer 3 Tage bei 20°, wo nicht anders angegeben. Ausbeuten an Carboxy-peptid in %.

Acyl-peptid-ester	Lösungsmittel <sup>a</sup>		
	96% Essigsäure	80% Dioxan	80% Aceton
Cbz-Gly-Gly-OMe	85	82 <sup>c</sup>	
Cbz-Gly-Gly-OEt	82		60 <sup>d</sup>
Cbz-Gly-DL-Phe-OEt	90	95	90
Cbz-Gly-DL-Phe-OEt	90	82 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>
Cbz-Gly-DL-Phe-OBz	88 <sup>b</sup>		70 <sup>d</sup>
Cbz-DL-Leu-Gly-OEt	92 <sup>c</sup>	87 <sup>c</sup>	90 <sup>d</sup>
Tos-DL-Leu-Gly-OMe	93 <sup>c</sup>		

<sup>a</sup> Volum-procent. <sup>b</sup> 4 Tage bei 25°. <sup>c</sup> 4 Tage bei 20°. <sup>d</sup> 5 Tage bei 20°.

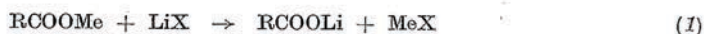
Um zu entscheiden, ob diese Reaktion eine Acidolyse oder eine Hydrolyse sei, gingen wir folgendem Gedankengange nach [Taschner E., Wasilewski Cz.: unveröffentlicht]: Wenn ein Ester einer racemischen Säure durch eine optisch aktive Säure acidolytisch gespalten wird, so sollte es zur teilweisen Trennung der beiden Antipoden kommen, da ja ihre Spaltungsgeschwindigkeiten verschieden sein müssen. Eine solche Trennung in Antipoden gelang uns tatsächlich, als wir verschiedene Äther des racemischen Mandelsäureesters mit D-Milchsäure oder mit D-Äthoxypropionsäure in Anwesenheit von Chlorwasserstoff als Protonenspender acidolytisch spalteten.

Wenn eine solche Spaltung mit 90% D-Milchsäure in Anwesenheit von Toluolsulfonsäure durchgeführt wurde, fand ebenfalls eine Trennung der Antipoden statt. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß auch die Spaltung der Peptidester mit 95% Essigsäure zum mindesten teilweise eine acidolytische ist.

Wir haben auch zusammen mit Herrn B. Liberek die Möglichkeit geprüft, die Estergruppen von Peptidestern auf nichthydrolytischem Wege mit Hilfe von Lithiumhalogeniden zu spalten.

Ester anorganischer Säuren werden durch Metallsalze gespalten [Walden P., Centnerszwer M.: Z. Elektrochem. 15, 310 (1909); Clark V. M., Todd A. R.: J. Chem. Soc. 1950, 2030]. Eine entsprechende Spaltung von organischen Estern ist in der Literatur nur kurz erwähnt [Cherbulier E., Leber J. P.: Helv. Chim. Acta 36, 1203 (1953)].

Unsere Versuche führten wir an Modellestern durch, welche wir mit Lithiumhalogeniden in Pyridin erwärmt, wobei nach (I) das Lithiumsalz der Säure und das entsprechende Alkylhalogenid entstand.



Das Pyridin, das sich als gutes Lösungsmittel für die Lithiumsalze und für die N-geschützten Aminosäure- und Peptidester erwies, bindet das in dieser Reaktion entstehende Alkylhalogenid, wodurch das Reaktionsgleichgewicht nach rechts verschoben wird.

Die Reaktion wird so durchgeführt, daß man 1 Millimol des Esters in 1–2 ml Pyridin löst und mit 1,2–3 Millimol des trockenen Lithiumhalogenids einige Stunden auf dem Wasser-

### Diskussion

bade oder zum Sieden erwärmt, wobei das Lithiumsalz der Säure oft kristallinisch ausfällt. Das Pyridin wird dann im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und der unveränderte Ester mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Aus der wäßrigen Schicht erhält man die Säure in sehr reiner Form.

Die Ausbeuten an freier Säure steigen in der Reihe LiCl < LiBr < LiJ an, wobei sich das LiBr am besten bewährte. Die Ausbeuten hängen auch von der Beschaffenheit der Alkoholkomponente ab. Sie fallen in der Reihe Methyl > Benzyl > Ethyl > Propyl > *sec*-Propyl ab, um bei den tertiären Estern wieder stark anzusteigen.

Einige Resultate sind in Tabelle II angeführt.

Peptid- und Amidbindungen, sowie auch die Tosyl- und Phthaloyl-schutzgruppen sind der Reaktion gegenüber äußerst beständig, selbst wenn man das Reaktionsgemisch stundenlang zum Sieden erhitzt. Dagegen sind die Ausbeuten bei den Carbobenzoxy-peptid-estern erniedrigt, da diese Schutzgruppe durch das LiBr gespalten wird.

Tabelle II  
Spaltung von Estergruppen mit Lithiumbromid  
Bedingungen siehe Text.

Ester <sup>a</sup>	Ausbeute, %	
	3 Stunden	8 Stunden
Bzo-Gly-OMe	95	
Bzo-Gly-OEt	80	
Bzo-Gly-OBz	90	
Phth-Gly-OMe	95	
Phth-Gly-OEt	25	
Bzo-DL-Phe-OMe	95	
Bzo-Gly-Gly-OMe	90	
Bzo-Gly-L-Tyr-OMe	60	82
Bzo-DL-Leu-Gly-OMe	80	
Phth-Gly-DL-Phe-OMe	66	95
Phth-DL-Phe-Gly-OMe	48	80
Tos-Gly-Gly-OMe	82	
Tos-DL-Leu-Gly-OMe	70	85
Cbz-Gly-DL-Phe-OMe	65	

<sup>a</sup> Bzo: Benzoyl.

Die Reaktion verläuft ohne Racemisierung; wenn Hippuryl-L-tyrosin-methylester 14 Stunden lang in LiBr-Pyridin zum Sieden erhitzt wurde, blieb die optische Aktivität unverändert.

BRENNER: Herr Rudinger, haben Sie auch beobachtet, daß Serinpeptidester bei hydrolytischer Abspaltung der Estergruppe noch anderweitig angegriffen werden?

RUDINGER: Wir haben wenig mit Serinestern gearbeitet. Am Anfang unserer Arbeit haben wir Serinester gehabt, aber unserer damaligen Technik möchte ich nicht soweit trauen, um die Resultate als stichhaltig zu bezeichnen.

WÜNSCH: Ich habe im Verlaufe unserer Arbeiten das Tripeptid, Glycyl-phenylalanyl-serin hergestellt, das dann später Grassmann und Hörmann für ihre Abbau-Untersuchung gebraucht haben. Der Carbobenzoxy-ester läßt sich glatt verseifen, jedoch geht die Verseifung etwas langsamer. Wenn man ganz kleine Mengen von Alkali, z. B. in Natronlauge in ganz kleinen Mengen, dem Verseifungsansatz in Dioxan-Wasser zusetzt, und den pH mit Thymolphthalein bei ungefähr 10 hält, dann ist der alkalische Angriff an der Carbobenzoxygruppe sehr gering. Die Verseifung dauert allerdings etwas länger als bei anderen Peptidestern.

BRENNER: War das der Methylester?

WÜNSCH: Sogar der Äthylester. Das erhaltene Peptid war vollkommen chromatographisch rein.

BRENNER: Wir müssen die Reaktionen der Carbobenzoxygruppe und der Serinpeptid-Bindung auseinanderhalten.

### Carboxyl-Schutzgruppen

WÜNSCH: Das Peptid selbst ist rein. Wir konnten keinerlei Reaktions-Nebenprodukte, die z. B. durch die Anwesenheit des Serins bedingt sein könnten, nachweisen.

BRENNER: Aber Herr Taschner, Sie haben doch gesagt, daß Peptidbindungen irgendwie in Mitleidenschaft gezogen werden!

TASCHNER: Ja, das ist eine Beobachtung von Zahn und Schnabel [Ann. 605, 212 (1957)].

WÜNSCH: Bei der sauren Verseifung bzw. bei der Veresterung des Glycyl-phenylalanyl-serins mit Chlorwasserstoff-Alkohol tritt teilweise Spaltung der Peptidbindung auf. Wahrscheinlich wird ein Diketopiperazin aus Phenylalanin und Serin gebildet; auf alle Fälle erhält man u. a. Glycinester. Und wenn man das Reaktionsgemisch nun nachträglich der Reduktion mit Lithiumborhydrid unterwirft, dann findet man nach der üblichen Aufarbeitung neben Serinol auch Glycinol.

TASCHNER: Zahn berichtet z. B., daß er nach der Verseifung von Carbobenzoxy-glycylserin-methylester chromatographisch Carbobenzoxy-glycin nachweisen kann; folglich spaltet sich dabei das Dipeptid.

WÜNSCH: Kein Serin?

TASCHNER: Das sagt er nicht. Aber die Ausbeuten sind 7–10%, es geht also eine Reaktion vor sich, die unübersichtlich ist.

WIELAND: Vielleicht kann man ganz allgemein sagen, daß sich bei der alkalischen Verseifung der Autotitrator bewährt. Man soll immer versuchen, nicht zu alkalisch zu stellen, sondern — so wie Herr Wunsch das mit der Hand macht — am Autotitrator ein pH von 9,5 einstellen und dann die Lauge automatisch zutropfen. Unter solchen Bedingungen geschieht, glaube ich, den anderen Gruppen sehr wenig. Auch ist es merkwürdig, daß eine Mischung von Wasser und Dioxan viel besser als Lösungsmittel geeignet ist, als Wasser allein, obwohl die Substanzen in Wasser löslich wären.

WÜNSCH: Auch Glykol eignet sich gut. Es scheint so als ob diese Lösungsmittel die Hydrolyse irgendwie katalysieren.

BRENNER: Besonders gut, noch besser als Methanol, ist eine Mischung von wäßriger Natronlauge und Aceton, das hat schon Bergmann mit seinen Mitarbeitern festgestellt. Ich habe keine Erklärung dafür. Die Lösungsmittelfrage ist hier sehr wichtig, aber ich glaube das würde uns zu weit führen, das jetzt alles herauszudiskutieren. Es bleibt nämlich noch übrig zu fragen, ob jemand mit der spezifischen Abspaltung der Amidgruppe Erfahrung hat. Herr Taschner hat ja auch die Amidgruppe erwähnt.

TASCHNER: Wenn man z. B. acidolytisch spaltet, wird die Amidgruppe nicht abgespalten, sogar beim Erhitzen. Wenn wir z. B. Peptidamide, also Derivate aliphatischer Amine, 8 Stunden lang mit Bromwasserstoff-Eisessig auf dem Wasserbad erhitzen, wurde die Amidgruppe nicht abgespalten.

RUDINGER: Das ist ja in unserer Glutaminsynthese auch so!

TASCHNER: Die von aromatischen Aminen abgeleiteten Amide werden dagegen durch Bromwasserstoff in Eisessig glatt gespalten.

WIELAND: Dann kann man wohl sagen, daß die Amidgruppe als Schutzgruppe des Carboxyls bis heute keine Rolle spielt. Man kann Amidgruppen auch mit salpetriger Säure nur schlecht entfernen; Sie haben das ja bei der Glutathionsynthese erwähnt. Es spielt nämlich an sich eine Rolle beim Abbau vom Carboxylende her: Es gibt da verschiedene Methoden die letzte Aminosäure abzuspalten; aber es bleibt da das Amid des verkürzten Peptids übrig und von ihm aus kommt man nicht mehr weiter, weil die Amidgruppe nicht spezifisch abgespalten werden kann, ohne die Peptidbindungen zu lösen.

RUDINGER: In einem Fall haben wir die Spaltung eines Hydrazids mit salpetriger Säure benützt. Das war in einer Arbeit von Herrn Zaoral; durch Hydrolyse konnte er kein reines Peptid erhalten und da ist er auf dem Umweg über Hydrazid, Azid, und alkalische Hydrolyse des Azids gegangen und hat kristallines Material erhalten. Ob das dem Stand der Sterne zuzuschreiben ist, oder ob es wirklich eine reinere Methode ist, wissen wir noch nicht.

WIELAND: Es ließe sich sicher ausarbeiten, aber es ist eben umständlich — drei Stufen.

VAJDA: Ich glaube, wir können spezifisch Peptidbindungen mit Glutaminsäure und Asparaginsäure und ihren Amidspalten, und ebenso bei Serin, wie schon Elliott 1952 am Serinfibroin beschrieben hat. Ich spaltete Insulin und auch Modellpeptide. Zum Beispiel konnte ich Insulin mit Chlorwasserstoff in Eisessig bei Glutaminsäure und auch bei Asparaginsäure, bei Asparagin usw. spalten — etwa zwölf Bindungen. Quantitative Untersuchungen habe ich noch nicht

### *Diskussion*

durchgeführt. Auf Grund der bisherigen qualitativen Untersuchungen scheint es aber, daß diese Spaltung spezifisch sein dürfte.\*

YOUNG: It may be useful to others to know that Brenner's method of esterification with thionyl chloride in methanol works well in the case of serine, which is particularly useful because Fischer's method, of course, gives poor yields.

RUDINGER: Ich möchte noch eine interessante Kleinigkeit erwähnen. Es ist bekannt, daß die Amidbindungen des Glutamins und Asparagins unter Bedingungen der Veresterung sehr leicht alkoholytisch gespalten werden. Wir haben unlängst mit Tosylglutamin und Tosylasparagin die Beobachtung gemacht, daß die Alkoholyse — obwohl sie in allen Fällen stattfindet — bei weitem am stärksten bei Tosylglutamin mit Methanol ist, viel weniger bei Tosylglutamin mit Äthanol, und noch geringer beim Tosylasparagin, daß also da ziemlich markante Unterschiede bestehen. Die Proteinchemiker beschwerten sich über diese Komplikation bei der Veresterung von Eiweißstoffen mit Methanol; vielleicht würde es also mit Äthanol besser gehen. Das betont wieder eine Sache auf die wir ja fortwährend stoßen — daß es sehr schwer ist, etwas allgemein zu sagen, ohne dann auf Spezialfälle zu kommen, wo es nicht stimmt!

---

\* Siehe Vajda T.: Chem. & Ind. (London) 1959, 197; Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 21, 71 (1959).

**SPECIAL PROBLEMS IN THE SYNTHESIS OF PEPTIDES  
FROM THE DIAMINO-MONOCARBOXYLIC  
AND MONOAMINO-DICARBOXYLIC ACIDS**

J. RUDINGER

*Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague*

The special problem of the diamino-monocarboxylic and monoamino-dicarboxylic acids is, of course, that they contain two identical functional groups of which as a rule only one is to be brought into reaction. Peptides in which the dicarboxylic acid is at the carboxyl end of the chain, or the basic amino-acid at the amino end, will not be dealt with in this connection since these present hardly any special problems; there are only certain points connected with the possibility of side reactions to which reference will be made later.

Any differential reaction in these polyfunctional compounds must be based on such differences as *do* exist between the two identical functional groups. It may sometimes be useful to keep in mind three possible sources of such differences: the first is the differing basicity or acidity of the two groups; the second is based on differences in the immediate steric environment of the two groups — i. e. classical steric hindrance effects; and the third, on special spatial relations between certain groups in the polyfunctional derivatives. The last could perhaps be called proximity effects.

For practical purposes, of course, this classification is not a very suitable one, and we shall not adhere to it in this review.

As regards the actual reaction in which the differences in reactivity are brought into play, we can from our point of view distinguish two possibilities: either it is the formation of a peptide bond itself which is directed in this way, or it is the preparation of some — differentially protected — derivative which then reacts in an unambiguous way in the actual peptide synthesis. The first kind of reaction is fairly frequent in the preparation of glutamic and aspartic acid peptides; but in the diamino acids it is the  $\omega$  amino group which is generally the more reactive, and since the  $\omega$  peptide derivatives have not so far been of very great interest differential protection is much the more important here.

#### Diamino-monocarboxylic Acids

The most important intermediates prepared from  $\alpha,\omega$ -diamino acids are the  $N^\omega$ -mono-protected compounds. A list of such intermediates which have been or might be used in peptide synthesis is given in Table I. For the preparation of these derivatives, there are several standard methods. First of all it is known<sup>1</sup> that at least in fairly strongly alkaline solution the  $\omega$  amino group is more reactive, and with a limited amount of the reagent  $N^\omega$ -derivatives are mainly formed (Method A in Table I). Kjaer<sup>1</sup> has stressed the necessity of strong alkalinity, and predicted that in weakly alkaline solution the  $N^\omega$ -

monosubstituted derivative should be preferentially formed. This does not appear to have been verified. We have found that, when  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid is tosylated in relatively weakly alkaline solution (0.5N-NaOH), some  $N^\alpha$ -tosyl derivative is, indeed, formed; but there is only about 3% of this as against 30% of the  $N^\omega$ -compound<sup>2</sup>. It seems that under these conditions the basicity effect does favour  $\alpha$ -acylation, but the opposing effect of steric hindrance at the secondary  $\alpha$  position outweighs it. We also have some evidence that steric hindrance effects are important for directing the reaction in phthaloylation with phthalic thioanhydride<sup>3</sup>. On the other hand, in one paper<sup>4</sup> the ratio of affinities of an acyl chloride for the  $\alpha$  and  $\epsilon$  amino groups in lysine is said to be the same in both strongly and weakly alkaline solution.

Preparatively, this type of synthesis, making use of differential reactivity in the free amino-acid alone, is not very extensively used. Probably the most widely useful method for preparing  $N^\omega$  derivatives involves the screening of the  $\alpha$  amino group as the copper complex — a proximity effect in our classification. This method, introduced by Kurtz<sup>5,6</sup>, is marked B in Table I. In the case of lysine and ornithine it is quite reliable, though the recorded yields seem to vary somewhat; but there is some doubt about diaminobutyric and diaminopropionic acid — here there is stoichiometric evidence<sup>7</sup> that the  $\omega$  amino group can also participate in the complex. Some authors<sup>8-10</sup>, including ourselves, have not been able to get as high yields of  $N^\omega$  derivatives from  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid as from ornithine and lysine; but normal yields have also been reported<sup>11</sup>. The decomposition of the copper complex of the product is not only the most unpleasant part of the procedure, but also appears to be responsible for low yields sometimes. Recently, cyanide has been introduced for this purpose<sup>12</sup>; perhaps it might also be possible to adapt some of the extraction methods or screening reagents for copper used in analytical chemistry to our purpose.

A third kind of approach is based on the selective removal of the protecting group from an identically disubstituted derivative (Method C in Table I). The classical example of this is Bergmann's method<sup>13</sup> for removing the  $N^\alpha$ -carbobenzoxy group from the dicarbobenzoxy derivative by way of the acid chloride and N-carboxyanhydride. This is once more a typical proximity effect. The reaction has been widely used, particularly for the direct preparation of esters of the  $N^\omega$ -substituted diamino acids; for the preparation of the acids themselves it has been found to be about equal in yields to the copper complex method but has been thought less convenient<sup>14-16</sup>. It is, of course, limited in this form to carbalkoxy derivatives — mainly carbobenzoxy compounds, though it should be applicable to carballyloxy derivatives as well (an N-carboxyanhydride has been prepared from the carballyloxy amino-acid chloride<sup>17</sup>). It is interesting that the intermediate N-carboxyanhydrides do not themselves seem to have been used for the synthesis of oligopeptides.

Another case of selective unmasking is the preparation of  $N^\epsilon$ -trityllysine and its peptides by acid treatment of the ditrityl derivatives under specific conditions<sup>18</sup>. There seems to be no obvious explanation for this, since the  $\alpha$ -tritylamino group should be the less easily protonated; perhaps it is an effect of the "relief of steric strain" type.

Recently, we have found that selective removal of protecting groups can also be achieved by way of acyl-lactams<sup>2</sup>; thus, the  $N^\alpha$ -tosyl group can be selectively removed from the lactam of ditosyldiaminobutyric acid (cf. p. 82).

*Diamino- and Dicarboxylic Acids*

**Table I**  
N<sup>ω</sup>-Monosubstituted Derivatives of the α,ω-Diamino Acids

N <sup>ω</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Method <sup>b</sup>	Ref.	N <sup>ω</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Method <sup>b</sup>	Ref.
L-α,β-Diaminopropionic Acid			L-Ornithine		
Cbz <sup>c</sup>	A	1	Cbz	B	15, 88
<i>d</i>	C	85	Tos	B	28, 89, 90
Cl <sub>a</sub>	A	86	Bz <sub>2</sub>	B	6
Tos.Gly <sup>c</sup>	A	87	Phth <sup>c</sup>	A	3
			<sup>c</sup>	D	21
L-α,γ-Diaminobutyric Acid			Cl <sub>a</sub>	C	20
			Tfa <sup>c</sup>	A	24
L-Lysine					
Cbz	A	10			
	B	9, 11			
Tos	A	2	Cbz	A	10
	B	8		B	14
	C	2		C	13
Bz <sub>2</sub>	B	6	Alc	B	91
Phth <sup>c</sup>	A	3	Tos	B	30
	D	21	Bz <sub>2</sub>	B	6
	E	<i>e</i>	Phth <sup>c</sup>	A	3
Cl <sub>a</sub>	C	19	<sup>c</sup>	D	21
Butc	B	<i>e</i>	Tfa <sup>c</sup>	A	24
Tos.lactam	C	2	Tr	C	18
	E	2	Che	?	33
Cbz.lactam	E	82			
Cpc	E	<i>e</i>			

<sup>a</sup> Alc allyloxycarbonyl, Butc butylthiocarbonyl, Bz<sub>2</sub> dibenzyl, Bz<sub>2</sub> benzenesulphonyl, Cl<sub>a</sub> chloroacetyl, Chc cyclohexyloxycarbonyl, Cpc cyclopentylloxycarbonyl, Cbz carbobenzyloxy, For formyl, Phth phthaloyl, Tfa trifluoroacetyl, Tos tosyl, Tos.Gly tosylglycyl, Tr trityl. Chloroacetyl is included as being convertible to glycyl, nitrile and azido groupings as being reducible to amino, and tosylglycyl as being removable by acid alcoholysis.

<sup>b</sup> A by direct acylation, B through the copper complex, C from identically disubstituted derivative, D synthetically, E from N<sup>α</sup> (Table I) or N<sup>ω</sup> (Table III) protected derivative.

<sup>c</sup> Racemic.

<sup>d</sup> Ester or ester hydrochloride.

<sup>e</sup> Unpublished work from these Laboratories.

**Table II**  
Non-identically N<sup>α</sup>,N<sup>ω</sup>-Disubstituted Derivatives of the α,ω-Diamino Acids

N <sup>ω</sup> -Substituent <sup>a</sup>	N <sup>α</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Ref.	N <sup>ω</sup> -substituent <sup>a</sup>	N <sup>α</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Ref.
α,β-Diaminopropionic Acid			L-α,γ-Diaminobutyric Acid — <i>continued</i>		
Cbz	Tos.Gly <sup>c</sup>	87	nitrile	Tos	25
Tos.Gly	Cbz <sup>c</sup>	87	nitrile	Cbz	25
			nitrile	Cpc	<i>e</i>
			nitrile	Tr	<i>e</i>
L-α,γ-Diaminobutyric Acid			L-Ornithine		
Cbz	Tos	9, 92	Cbz	Tos	9, 25
Cbz	tBC	<i>e</i>	Tos	Cbz <sup>c</sup>	<i>e</i>
Tos	Cbz	82	Tos.lactam	Tos	<i>e</i>
Tos	tBC	2	nitrile	Phth <sup>d</sup>	25
Phth	Tos	<i>e</i>			
Phth	N <sub>3</sub> <sup>c</sup>	94	L-Lysine		
Cpc	Tos	<i>e</i>	Cbz	Tos	9
Cbz.lactam	Cbz	80	Cbz	Bz <sub>2</sub>	13
Cbz.lactam	tBC	<i>e</i>	Cbz	For	95
Tos.lactam	Tos	82	Cbz	tBC	96, 97
Tos.lactam	Cbz	82	Cbz	Cbz	30
Tos.lactam	tBC	2	Tos		

**Table III**  
N<sup>α</sup>-Monosubstituted Derivatives of the α,ω-Diamino Acids

N <sup>α</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.	N <sup>α</sup> -Substituent <sup>a</sup>	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.
L-α,β-Diaminopropionic Acid			L-Ornithine — <i>continued</i>		
Tos	D	<i>e</i>	Phth <sup>d</sup>	D	25
			Tfa	A	23
L-α,γ-Diaminobutyric Acid			L-Lysine		
Tos	A	2			
	D	25, <i>e</i>	Tos	E	93
	E	93	Bz <sub>2</sub>	E	13
			For	E	95
L-Ornithine			Tfa <sup>c</sup>	A	23
Tos	D	25	Bz <sub>2</sub>	E	18
	E	25, 93			

The product, L-3-amino-1-tosylpyrrolid-2-one, is itself a very useful intermediate; and for the preparation of N<sup>γ</sup>-tosyl- $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid this method is about equal to others in yield and convenience. With ornithine, the reaction seems to be more complex.

The selective removal of N <sup>$\alpha$</sup>  acyl groups can also be effected by enzymes<sup>19,20</sup>. This method is interesting in that it can be used to resolve racemates at the same time; on the other hand, the acyl groups most suitable for this purpose (e. g. chloroacetyl) are not much use from the synthetic point of view.

In certain cases, usefully N <sup>$\omega$</sup> -substituted derivatives have been obtained as intermediates in the synthesis of the basic amino-acids themselves, e. g., N <sup>$\omega$</sup> -phthaloyl compounds<sup>21</sup> (Method D in Table I). The great drawback here is, of course, that the products are racemic, but if suitable methods of resolution could be found such preparations might be convenient in certain cases, for instance in work with labelled compounds.

In Table II, some derivatives substituted with different protecting groups in the  $\alpha$  and  $\omega$  positions are listed. The use of such derivatives in peptide synthesis becomes absolutely necessary only in very special cases, e. g. in the synthesis of branched cyclic peptides. In building simple linear peptides, the N <sup>$\omega$</sup> -monosubstituted derivatives shown in Table I can be introduced at the carboxyl end of the fragment and the whole peptide used in further synthesis. Even in such cases, however, the availability of differentially disubstituted derivatives gives much greater tactical freedom in the choice of synthetic routes.

Finally, Table III lists some N <sup>$\alpha$</sup> -monosubstituted derivatives which have been prepared. They are rather more difficult of access than the N <sup>$\omega$</sup> -derivatives. Cases of direct acylation on N <sup>$\alpha$</sup>  are rather rare. Kolb and Toennies have assumed<sup>22</sup> — though without preparative evidence — that acetylation and formylation in acid media give the N <sup>$\alpha$</sup> -acyl derivatives in the first stage; and trifluoroacetic anhydride in trifluoroacetic acid has, indeed, been shown<sup>23</sup> to yield the N <sup>$\alpha$</sup> -derivative preferentially, while the ethyl thioester acylates the  $\omega$  amino groups<sup>24</sup>. As has already been noted, some N <sup>$\alpha$</sup>  derivative is also formed in direct acylation under conditions of low alkalinity, and sometimes solubility properties may allow it to be isolated; but this is not as a rule a very good preparative method.

A more usual route to the  $\alpha$  derivatives is through N <sup>$\alpha$</sup> -substituted intermediates (Method E in Table III); a number of them have also been prepared by synthetic reactions, by formation of the  $\omega$  amino group e. g. from the amides through nitriles<sup>25</sup>. Such nitriles are, incidentally, intermediates through which side-chain amino groups may be introduced not only into amino-acid derivatives, but even into finished peptides.

There may perhaps be a possibility of exploiting the lactams of  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid, ornithine, and even lysine, which are readily accessible from the esters of these amino-acids, for the preparation of N <sup>$\alpha$</sup> -monosubstituted derivatives or even peptides<sup>26</sup>. Though the alkaline hydrolysis of the lactam ring requires conditions so drastic that probably only tosyl<sup>25</sup> or trityl groups will stand up to them there may be a possibility here of applying the acid-catalysed alcoholysis which has been successfully used with pyroglutamic acid derivatives.

As for the actual synthetic operations with all these intermediates, the possibilities and limitations are given by the types of protecting groups present. Only in the case of  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid, and particularly its N<sup>γ</sup>-tosyl derivative, are there serious difficulties of a specific kind, due to the very easy cyclisation of carboxyl-activated intermediates to the N-acyl-lactams.

To put the practical importance — up to now — of these various possibilities into perspective it might be useful to recall the actual intermediates used in some recent work on basic peptides. In the various syntheses of peptides related to gramicidin S, the  $\delta$ -amino group of ornithine has been protected by carbobenzoxy<sup>27</sup> or tosyl<sup>28,29</sup>; as the "removable" protecting group, phthalyl has been used in combination with carbobenzoxy<sup>27</sup>, and carbobenzoxy<sup>28,29</sup> or trityl<sup>29</sup> in conjunction with  $N^\delta$ -tosyl. The tosyl-carbobenzoxy combination has also been used by du Vigneaud's school in the synthesis of lysine vasopressin<sup>30</sup>, and trityl with carbobenzoxy by Boissonnas and his co-workers in their work on ACTH peptides<sup>31</sup>. We have found the tosyl-carbobenzoxy combination useful in our work on diaminobutyric acid peptides, with the activated lactam or azide method for peptide bond formation<sup>2</sup>; we have also removed carbobenzoxy or tosyl with phthalyl as the other protecting group<sup>32</sup>. Recently, cyclohexyloxycarbonyl has been used for the protection of the  $\epsilon$ -amino group in lysine, with carbobenzoxy for the normal end-group covering<sup>33</sup>. It is perhaps worth stressing that the tosyl-phthalyl, carbobenzoxy-phthalyl, carbobenzoxy-*tert*-butoxycarbonyl, tosyl-*tert*-butoxycarbonyl<sup>32</sup>, tosyl-cyclopentyloxycarbonyl<sup>32</sup>, and butylthiocarbonyl-carbobenzoxy combinations can be removed in either order, and so give an increased tactical freedom which could be useful in certain cases.

### Monoamino-dicarboxylic Acids

In the case of the dicarboxylic acids, as has already been noted, differential reactivity in reactions leading directly to peptide bond formation has played an important part, particularly in the "classical" period of peptide synthesis. The possibility of bringing only one of two free carboxyl groups into reaction seems to be very limited. It has been done with tritylglutamic acid and carbodiimide<sup>34</sup>, and with *N*-benzylaspartic acid as the mixed anhydride with chloroformic acid<sup>35</sup>; though it does not seem definitely excluded that cyclic anhydrides might be intermediates in such reactions. The great majority of direct syntheses has been based on the fact that the cyclic anhydrides, which are readily formed from most acylglutamic and acylaspartic acids, usually show a greater or lesser degree of selectivity in their reactions at the two carbonyl groups. The same type of differential reaction is also commonly used in the preparation of suitably protected intermediates for peptide synthesis — in fact the two approaches are often complementary; and some of the data available in the literature on the direction of ring-opening in various anhydrides of protected glutamic and aspartic acids have therefore been collected in Tables IV and V.

The ring-opening of carbobenzoxyglutamic anhydride was originally thought to give  $\alpha$ -derivatives exclusively<sup>36</sup>. Gradually it became accepted that the  $\gamma$ -compounds were formed as well, and where conditions were suitable they could, in fact, be isolated<sup>37</sup>. A very valuable technique was developed for this purpose by Le Quesne and Young<sup>38</sup>, based on the differential extraction of the two products — which differ in the acidities of the free carboxyl — with alkali carbonate. We were able to show<sup>39</sup> that countercurrent distribution was another very efficient technique for this purpose, and it has, indeed, been used several times since<sup>40-43</sup>. Phthalylglutamic anhydride, as can be seen from Table IV, as a rule gives high yields of the  $\gamma$ -derivatives, though treatment with sodium methoxide appears to give the  $\alpha$ -methyl ester as the chief product<sup>44</sup>. From

Rudinger:

Table IV  
Ring-opening of Some Acylglutamic Anhydrides  
Yields (%) of products formed by reaction at the  $\gamma$  and  $\alpha$  carbonyl<sup>a</sup>.

Nucleophile	Cbz			Phth			Tfa		
	$\gamma$	$\alpha$	ref.	$\gamma$	$\alpha$	ref.	$\gamma$	$\alpha$	ref.
MeOH				80-92.5 16 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	44,53 44			
EtOH	17	51	39				27	64	104
BzOH		18	38	90		53,100			
NH <sub>3</sub>	14	36	98	77		101			
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>				86 <sup>c</sup>		101	?	75	105,106
H.Gly.OR	5-5	31-38	38,40	75		53			
NH <sub>2</sub> .CHR.CO <sub>2</sub> R'	?	30-50	37,38,98,99	74-80		102,103			
NH <sub>2</sub> .NH <sub>2</sub>	92-12	8-88	38	85		100			
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SH	33-96	67-4	45,47	84		47			

<sup>a</sup> Figures in italics are analytically determined compositions of crude product.

<sup>b</sup> Sodium alcoholate.

<sup>c</sup> Ethyl *p*-aminobenzoate gives 93% of  $\gamma$ -derivative<sup>107</sup>

trifluoroacetylglutamic anhydride, mixtures are formed with the  $\alpha$ -derivative predominating. Later it turned out that the direction of reaction is influenced not only by the nature of the acyl group and, presumably, the nature of the reacting nucleophile, but also by the reaction conditions<sup>45-47</sup>, particularly the polarity of the solvent and strength of the base present. These effects were convincingly demonstrated by Wieland and Weidenmüller<sup>47</sup> for the reaction of carbobenzoxyglutamic anhydride with thiophenol.

Similar results are available for aspartic acid derivatives (Table V). Here obviously the direction of ring-opening is still more variable than in the glutamic acid series — this is particularly evident if we compare the reactions of the phthalyl compounds.

Table V  
Ring-opening of Some Acylaspartic Anhydrides<sup>a</sup>  
Yields (%) of products formed by reaction at the  $\beta$  and  $\alpha$  carbonyl.

Nucleophile	Cbz			Phth			Tfa			Bz		
	$\beta$	$\alpha$	ref.	$\beta$	$\alpha$	ref.	$\beta$	$\alpha$	ref.	$\beta$	$\alpha$	ref.
MeOH				36	57	112						
EtOH		57 <sup>b</sup>	108,109					72	114			
BzOH		85 <sup>b</sup>	110									
NH <sub>3</sub>		71	36	91		113				71	115	
	35-29 <sup>c</sup>	61-67 <sup>c</sup>	43		80	46						
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>								70	114	70 <sup>d</sup>	16 <sup>d</sup>	115
H.Gly.OEt	21	19	108									
NH <sub>2</sub> .CHR.CO <sub>2</sub> R'	15-27	21-40	77,108,111							44-53		115

<sup>a</sup> Tosylaspartic anhydride with benzyl alcohol gives 18% of the  $\beta$  and 65% of the  $\alpha$  ester<sup>116</sup>.

<sup>b</sup> Sodium alcoholate.

<sup>c</sup> *p*-Nitrocarbobenzoxyaspartic anhydride.

<sup>d</sup> *p*-Toluidine.

The complexity of the effects influencing the direction of ring-opening is obviously due to the possibility of two different, rather closely balanced mechanisms (cf. e. g.<sup>47</sup>). The practical conclusion to be drawn is that the reaction with cyclic anhydrides will certainly remain important for the preparation both of intermediates and of the peptides themselves, particularly in relatively simple and tested cases; but it is perhaps a risky method to use with more valuable material in an unknown case. The use of separation procedures to offset these difficulties is only a special case of the more general problem of separation *versus* unambiguous synthesis which appears to be becoming quite an important one in peptide synthesis.

The recent tendency has been to use derivatives of defined structure as starting-points in syntheses. The monoesters are usually key intermediates in any such methods. A list of monoesters and unsymmetrical diesters which are available for this purpose is given in Tables VI and VII, together with their methods of preparation.

Most of the  $\gamma$ -esters of glutamic acid originate from the esterification of the free acid (Method A). It is, however, interesting that even so simple a reaction as the esterification of glutamic acid with ethanol<sup>48</sup> has given quite a lot of trouble, and new experimental procedures are still being described after all these years which claim to be better reproducible than their predecessors<sup>17,49-52</sup>. The copper complex method, though applicable in principle, has been used only exceptionally<sup>50</sup>. The phthalyl  $\gamma$ -esters can, of course, be obtained by ring-opening from the anhydride (Method B) and serve to direct synthetic reactions to the  $\alpha$ -carboxyl in these derivatives<sup>53</sup>. The carbobenzoxy- $\alpha$ -glutamates can also be obtained from the anhydride, as has already been discussed. The situation with aspartic acid derivatives (Table VII) is rather similar, but obviously fewer of these have been prepared. Differential hydrolysis of diesters (Method E) has also been used, as in the preparation of  $\beta$ -benzyl carbobenzoxyaspartate<sup>54</sup> (alkaline hydrolysis), and from it the free amino ester (this procedure is not satisfactory in the glutamic acid series<sup>50</sup>), or of  $\alpha$ -benzyl glutamate (acid hydrolysis)<sup>55</sup>. An interesting reaction is the differential alkaline alcoholysis of dibenzyl trityl aspartate<sup>56</sup> or the corresponding glutamate<sup>57</sup> at the  $\omega$  carbonyl to give the  $\alpha$ -benzyl  $\beta$ - (or  $\gamma$ -)methyl esters.

The free carboxyl of the monoesters can be brought into reaction by most of the usual methods. The ester chlorides have been used in the past, and still are occasionally. On general grounds one would expect the possibility of ester exchange here, but it is only fair to say that this does not seem to have been actually proved. The mixed anhydride, phosphite anhydride, phosphorazo, isocyanate, thioester, carbodiimide, and activated ester procedures have all been successfully used: However, the difficulty arises at a subsequent stage — in the alkaline hydrolysis of the esters, which is liable to be attended by imide ring formation and "transpeptidation", i. e. migration from one carboxyl to the other<sup>41,58</sup>. This reaction will be dealt with in more detail by Dr Medzihradsky (cf. p. 107). The only safe way of avoiding these troubles seems to be the use of benzyl esters and reductive cleavage<sup>59</sup>. It would no doubt be useful to examine the acid hydrolysis or solvolysis of such esters, or look for further carboxyl protecting groups which can be removed non-hydrolytically.

The other route from monoesters is through the hydrazides. This method was used in much of the folic acid work, and developed and refined particularly by Young and his co-workers<sup>49,60</sup> (cf.<sup>61</sup>). Unfortunately it has again turned

Table VI  
Some Esters of L-Glutamic Acid and Protected L-Glutamic Acids

$\gamma$ -Monoesters				$\alpha$ -Monoesters			
N-Protecting group <sup>a</sup>	Ester	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.	N-Protecting group <sup>a</sup>	Ester	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.
—	OMe	A	50,51,100c,117,118	—	OMe	B'	119
—	OEt	(B')	100c,119	—	OEt	B'	38,119
—	OPr	A	17,36,48d-52,74,120	—	OPr	B'	119
—	OPr	(B')	119	—	OBz	E	55
—	OBz	A	51	—	OBz	B'	45
—	OBz	(B')	119	Cbz	OEt	B	38,39,124
—	OBz	A	42,50,121	Cbz	OBz	B	38
—	OBz	C	50	—	OBz	E''	55
Cbz	OMe	A''	50,117	Cbz	SPh	B	45,47
Cbz	OEt	A''	38c,48d,120	Phth	OMe	B	44c
—	OBz	(B)	39	—	OBz	D	53
Cbz	OBz	A''	50,122	Tr	OMe	E	57
Cbz	SPh	B	45c,47	Tr	OEt	E	57
Phth	OMe	B	44c,53,100c	Tfa	OEt	B	104
Phth	OBz	B	53,100c	Unsymmetrical Diesters			
Phth	SPh	B	47	Protecting group <sup>a</sup>	$\gamma$ -Carb-oxyl	$\alpha$ -Carb-oxyl	Ref.
Tr	OMe	D	57	Cbz	OEt	SPh	45
Tfa	OEt	B	104,106	Phth	OBz	OMe	53
Alc	OEt	A''	17	Tr	OMe	OBz	57
For	OBz	A''	123				
Tos	OMe	E	93				

Table VII  
Some Esters of L-Aspartic Acid and Protected L-Aspartic Acids

$\beta$ -Monoesters				$\alpha$ -Monoesters			
N-Protecting group <sup>a</sup>	Ester	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.	N-Protecting group <sup>a</sup>	Ester	Method of preparation <sup>b</sup>	Ref.
—	OMe	A	51c	—	OEt	B'	108,109c
—	OBz	E'	125	Cbz	OEt	B	108,109c
Cbz	OBz	E	54	Cbz	OBz	B	110,126
Phth	OMe	B	112c	Tfa	OEt	B	114
Tos	OBz	B	116c	Phth	OMe	B	112c
				Tos	OBz	B	116c
Unsymmetrical Diesters							
N-Protecting group <sup>a</sup>	$\beta$ -Carb-oxyl	$\alpha$ -Carb-oxyl	Ref.				
—	OMe	OBz	56				
Tr	OMe	OBz	56				

<sup>a</sup> See footnote to Tables I—III.  
<sup>b</sup> A direct esterification, B anhydride ring-opening, C through copper complex, D through carboxyl-protected derivative, E selective hydrolysis of symmetrical diester; *single prime*: followed by removal of N-protecting group, *double prime*: followed by acylation; *parentheses* denote methods of doubtful preparative utility.

<sup>c</sup> Racemic derivative. <sup>d</sup> Wrongly characterised as  $\alpha$ -ester.

out that even in azide syntheses, if a free carboxyl group is present, migration of the active centre can take place<sup>62,63</sup>. The obvious way of preventing this, by esterifying the free carboxyl as we did in one case some time ago<sup>64</sup>, only postpones the difficulty to the ester hydrolysis stage. Here again benzyl esters seem to be the only safe way; or we may be reconciled to the side reaction and rely on being able to separate the products.

Enzymic discrimination between the two carboxyl groups has occasionally been exploited, as in the synthesis of carbobenzoxyglutamic acid  $\alpha$ -carbobenzoxyhydrazide<sup>65</sup>. It seems that there are interesting possibilities here, particularly in work with higher peptides or with racemic starting materials.

For completeness, it should be mentioned that there is one method for the preparation of  $\beta$ -aspartyl peptides based on the completion of the aspartic acid structure after formation of the peptide bond — the addition of ammonia<sup>66</sup> or benzylamine<sup>67</sup> to the maleamic acids. The method suffers from the disadvantage of giving sterically inhomogeneous products; it might perhaps be an interesting model for studying asymmetric induction in this type of compounds.

### Glutamine and Asparagine

In connection with recent synthetic work e. g. on oxytocin and vasopressin, the hypertensins, the algal peptide eisenin and others, much attention has been given to ways of synthesising peptides containing the amide amino-acids, glutamine and asparagine. In principle, there are, of course, two possibilities: either to carry out the synthesis with derivatives of the amides themselves, or to introduce the amide group at some later stage in the synthesis. The first alternative is more attractive in the case of asparagine, which is readily available as such; the second is very much more common with glutamine, since glutamic acid is invariably the starting material here.

First, as to indirect methods. The early workers started from compounds containing free carboxyl groups and converted them to amides by way of the chlorides. At present it is much more usual to carry the  $\beta$  or  $\gamma$  carboxyl through the synthesis as an ester, and ammonolyse it in the end. This reaction, incidentally, is not always easy in the case of higher peptides<sup>68</sup>; perhaps hydrazinolysis followed by Raney nickel treatment might prove useful in some cases. Another form of potential amide group is the N-arylsulphonylpyroglutamic acid grouping<sup>68-71</sup>, but this by its nature is confined to amino-terminal glutamine residues.

The use of the amides themselves in peptide synthesis has also presented some specific difficulties. If we wish to use them as amino components in coupling reactions we are either compelled to work with aqueous solutions, or to prepare the amide esters by rather round-about routes, since the very easy alcoholysis of the amide group complicates esterification by the usual direct methods. On the other hand, the use of the protected amides as activated carboxyl components is often unsatisfactory. The development of the azide synthesis for this purpose<sup>72</sup> seems promising; with all other methods, there have been numerous complaints (e. g. <sup>73-76</sup>) — or uncomplaining reports of poor yields<sup>77</sup> — particularly in work with acylasparagines. The actual offending side reactions are not quite clear even now. There certainly is the possibility of imide ring formation again, and recently the Cornell school<sup>78,79</sup> and, from a different angle, our group at Prague<sup>25</sup> have been able to show that the amide

groups can also be dehydrated to nitrile under the conditions of many peptide syntheses.

On the other hand, we believe that there may be some chance of turning the tables and using this reaction to our own ends. The nitrile group is quite stable to some of the operations of peptide chemistry — though not, of course, to reduction; and by hydrogen bromide in acetic acid, even under rather mild conditions, it can be converted back to amide<sup>25</sup>. This does suggest a method for "protecting" amide groups.

In conclusion, I should like to mention the question of activated lactams, though it does not fit into the general scheme of treatment in this review. There are, in fact, good reasons for this. For one, the problem is specific for glutamic acid,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid, and, partly, ornithine; and for another, it can figure as an undesirable side reaction<sup>2,80-83</sup>, or as a method of carboxyl protection (as in the synthesis of  $\alpha$ -glutamyl peptides<sup>69</sup>) or of carboxyl activation ( $\gamma$ -glutamyl peptides<sup>69,84</sup>,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyryl peptides<sup>2,10,82</sup>), or we may regard it as a potential amide<sup>68-71</sup> or even side-chain amino grouping<sup>25</sup>. It will perhaps be best to deal with these points in the discussion.

## References\*

1. Kjaer A.: *Acta Chem. Scand.* **3**, 1087 (1949).
2. Poduška K., Rudinger J.: *This Journal* **24**, 3449 (1959).
3. Zaoral M., Černík V.: *This Journal*, in the press; Černík V.: *Diploma Thesis*. Charles University, Prague 1958.
4. Naudet M., Desnouelle P.: *Bull. soc. chim. France*. **1948**, 1143.
5. Kurtz A. C.: *J. Biol. Chem.* **122**, 477 (1938).
6. Kurtz A. C.: *J. Biol. Chem.* **180**, 1253 (1949).
7. Woiwod A. J.: *Biochem. J.* **45**, 412 (1949).
8. Christensen H. N., Riggs T. R.: *J. Biol. Chem.* **220**, 265 (1956).
9. Barrass B. C., Elmore D. T.: *J. Chem. Soc.* **1957**, 3134.
10. Zaoral M., Rudinger J., Šorm F.: *Chem. listy* **47**, 427 (1953); *This Journal* **18**, 530 (1956).
11. Kurihara T., Suzuki K.: *J. Pharm. Soc. Japan* **75**, 1269 (1955).
12. Zahn H., Zuber H., Ditscher W., Wegerle D., Meienhofer J.: *Chem. Ber.* **89**, 407 (1956).
13. Bergmann M., Zervas L., Ross W. F.: *J. Biol. Chem.* **111**, 245 (1935).
14. Neuberger A., Sanger F.: *Biochem. J.* **37**, 515 (1943).
15. Synge R. L. M.: *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).
16. Schlögl K., Fabischowitz H.: *Monatsh.* **84**, 937 (1953).
17. Green M., Stahmann M. A.: *J. Biol. Chem.* **197**, 771 (1952).
18. Amiard G., Goffinet B.: *Bull. soc. chim. France* **1957**, 1133.
19. Fu S.-C. J., Rao K. R., Birnbaum S. M., Greenstein J. P.: *J. Biol. Chem.* **199**, 207 (1952).
20. Levintow L., Greenstein J. P.: *J. Biol. Chem.* **188**, 643 (1951).
21. Balenović K., Jambrešić I., Furić I.: *J. Org. Chem.* **17**, 1459 (1952).
22. Kolb J. J., Toennies G.: *J. Biol. Chem.* **144**, 193 (1942).
23. Weygand F., Geiger R.: *Chem. Ber.* **89**, 647 (1956).
24. Schallenberg E. E., Calvin M.: *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2779 (1955).
25. Zaoral M., Rudinger J.: *Proc. Chem. Soc. (London)* **1957**, 176; *This Journal* **24**, 1993 (1959).
26. Bergmann M., Köster H.: *Z. physiol. Chem.* **167**, 91 (1927).
27. Schumann I., Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* **35**, 2237 (1952).
28. Erlanger B. F., Sachs H., Brand E.: *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1806 (1954).
29. Schwyzer R., Sieber P.: *Helv. Chim. Acta* **40**, 624 (1957).
30. Roeske R., Stewart F. H. C., Stedman R. J., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5883 (1956).
31. Boissonnas R. A., Guttmann S., Waller J.-P., Jaquenoud P.-A.: *Experientia* **12**, 446 (1956).
32. Zaoral M., Rudinger J.: Unpublished results.

\* References to work which has been published since this paper was read have been completed.

*Diamino- and Dicarboxylic Acids*

33. Lautsch W., Schulz G.: *Naturwiss.* 45, 58 (1958).
34. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 698.
35. Liwshitz Y., Zilkha A.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3698 (1954).
36. Bergmann M., Zervas L.: *Ber.* 65, 1192 (1932).
37. Semb J., Boothe J. H., Angier R. B., Waller C. W., Mowat J. H., Hutchings B. L., SubbaRow Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2310 (1949).
38. Le Quesne W. J., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* 1950, 1954.
39. Rudinger J.: *This Journal* 16, 615 (1951).
40. Pravda Z.: *Candidate's Thesis*. Institute of Chemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague 1955.
41. Battersby A. R., Robinson J. C.: *J. Chem. Soc.* 1955, 259.
42. Clayton D. W., Kenner G. W., Sheppard R. C.: *J. Chem. Soc.* 1956, 371.
43. Chambers R. W., Carpenter F. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1522 (1955).
44. Sheehan J. C., Bolhofer W. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 72, 2469 (1950).
45. Sachs H., Waelsch H.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 6600 (1955).
46. Tannenbaum S. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1754 (1954).
47. Wieland T., Weidenmüller H. L.: *Ann.* 597, 111 (1955).
48. Abderhalden E., Nienburg H.: *Z. physiol. Chem.* 219, 155 (1933).
49. Rowlands D. A., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* 1952, 3937.
50. Hanby W. E., Waley S. G., Watson J.: *J. Chem. Soc.* 1950, 3239.
51. Coleman D.: *J. Chem. Soc.* 1951, 2294.
52. Pravda Z.: *Chem. listy* 52, 1193 (1958); *This Journal* 24, 2083 (1959).
53. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* 1957, 886.
54. Frankel M., Berger A.: *J. Org. Chem.* 16, 1513 (1951); Berger A., Katchalski E.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4084 (1951).
55. Sachs H., Brand E.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4610 (1953).
56. Velluz L., Amiard G., Bartos J., Goffinet B., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 1464.
57. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 97.
58. Sondheimer E., Holley R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2467 (1954).
59. Sachs H., Brand E.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4608 (1953).
60. Le Quesne W. J., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* 1950, 1959.
61. Fodor P. J., Miller A., Neidle A., Waelsch H.: *J. Biol. Chem.* 203, 991 (1953).
62. Sachs H., Brand E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1815 (1954).
63. Rowlands D. A., Young G. T.: *Biochem. J.* 65, 516 (1957).
64. Šorm F., Rudinger J.: *This Journal* 15, 491 (1950).
65. Hofmann K., Lindenmann A., Magee M. Z., Khan N. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 470 (1952).
66. Fischer E., Koenigs E.: *Ber.* 37, 4585 (1904).
67. Liwshitz Y., Zilkha A.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1265 (1955).
68. Rudinger J., Pravda Z.: *Chem. listy* 52, 120 (1958); *This Journal* 23, 1947 (1958).
69. Rudinger J.: *Chem. listy* 48, 244 (1954); *This Journal* 19, 375 (1954).
70. Swan J. M., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3110 (1954).
71. Swan J. M.: *Proc. Internat. Wool Textile Research Conference, Australia* 1955, p. C-175.
72. Sondheimer E., Holley R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2816 (1954).
73. Leach S. J., Lindley H.: *Australian J. Chem.* 7, 173 (1954).
74. Miller H. K., Waelsch H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 176 (1952).
75. Boissonnas R. A., Guttman S., Waller J.-P., Jaquenoud P.-A.: *Helv. Chim. Acta* 38, 1491 (1955).
76. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: *Chem. listy* 50, 288 (1956); *This Journal* 21, 202 (1956).
77. Fisher R. F., Whetstone R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 750 (1955).
78. Gish D. T., Katsoyannis P. G., Hess G. P., Stedman R. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5954 (1956).
79. Ressler C.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5956 (1956).
80. Wilkinson S.: *J. Chem. Soc.* 1951, 104.
81. Harington C. R., Moggridge R. C. G.: *J. Chem. Soc.* 1940, 706.
82. Poduška K., Rudinger J.: *Chem. listy* 51, 616 (1957); *This Journal* 22, 1283 (1957).
83. Rudinger J., Poduška K., Zaoral M., Jošt K.: *This Journal* 24, 2013 (1959).
84. Rudinger J., Czurbová H.: *Chem. listy* 48, 254 (1954); *This Journal* 19, 386 (1954).
85. Schneider F.: *Ann.* 529, 1 (1937).
86. Miyanoki Y.: *J. Biochem. (Japan)* 13, 389 (1931); *Chem. Zentr.* 1933, II, 2686.
87. Poduška K., Rudinger J., Šorm F.: *Chem. listy* 49, 737 (1955); *This Journal* 20, 1174 (1955).
88. Harris J. I., Work T. S.: *Biochem. J.* 46, 582 (1950).
89. Christensen H. N.: *J. Biol. Chem.* 160, 75 (1945).
90. Izumiya N.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 26, 53 (1953).

*Rudinger*

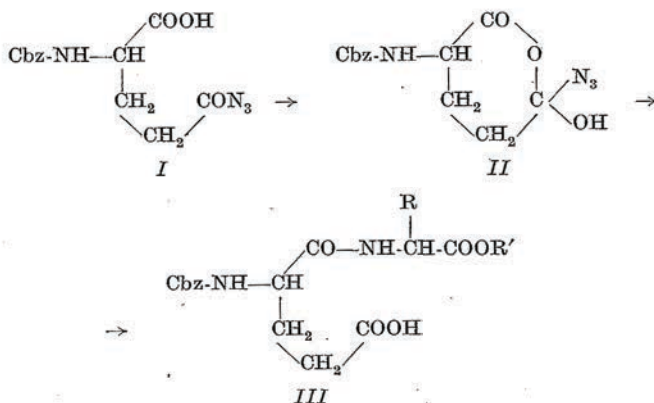
91. Stevens C. M., Watanabe R.: *J. Am. Chem. Soc.* *72*, 725 (1950).
92. Rudinger J.: *Chem. listy* *48*, 235 (1953); *This Journal* *19*, 356 (1954).
93. Barrass B. C., Elmore D. T.: *J. Chem. Soc.* *1957*, 4830.
94. Zaoral M.: *Chem. listy* *52*, 2338 (1958); *This Journal* *24*, 1314 (1959).
95. Wolf D. E., Valiant J., Peck R. L., Folkers K.: *J. Am. Chem. Soc.* *74*, 2002 (1952).
96. McKay F., Albertson N. E.: *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 4686 (1957).
97. Anderson G. W., McGregor A. C.: *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 6180 (1957).
98. Melville J.: *Biochem. J.* *29*, 179 (1935).
99. Bergmann M., Zervas L., Salzmann L., Schleich H.: *Z. physiol. Chem.* *224*, 17 (1934).
100. King F. E., Jackson B. A., Kidd D. A. A.: *J. Chem. Soc.* *1951*, 243.
101. King F. E., Kidd D. A. A.: *J. Chem. Soc.* *1949*, 3315.
102. Hanson H., Illhardt R.: *Z. physiol. Chem.* *228*, 210 (1954).
103. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* *1957*, 880.
104. Weygand F., Geiger R.: *Chem. Ber.* *90*, 634 (1957).
105. Weygand F., Leising E.: *Chem. Ber.* *87*, 248 (1954).
106. Weygand F., Reiher M.: *Chem. Ber.* *88*, 26 (1955).
107. King F. E., Clark-Lewis J. W., Smith G. R.: *J. Chem. Soc.* *1954*, 1044.
108. Le Quesne W. J., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* *1952*, 24.
109. Bruckner V., Vajda T., Kovács J.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* *6*, 209 (1955).
110. Bergmann M., Zervas L., Salzmann L.: *Ber.* *66*, 1288 (1933).
111. John J. D., Young G. T.: *J. Chem. Soc.* *1954*, 2870.
112. King F. E., Clark-Lewis J. W., Smith G. R.: *J. Chem. Soc.* *1954*, 1046.
113. King F. E., Kidd D. A. A.: *J. Chem. Soc.* *1951*, 2976.
114. Weygand F., Klinke P., Eigen I.: *Chem. Ber.* *90*, 1896 (1957).
115. Zilkha A., Liwischitz Y.: *J. Chem. Soc.* *1957*, 4397.
116. Bovarnick M. R.: *J. Biol. Chem.* *148*, 151 (1943).
117. Tani H., Noguchi J.: *Chem. High Polymers (Japan)* *8*, 57 (1951); *Chem. Abstr.* *48*, 125e (1954).
118. Kovács J., Bruckner V., Kovács K.: *J. Chem. Soc.* *1953*, 145.
119. Matsukawa T., Masuda K.: *J. Pharm. Soc. Japan* *73*, 397 (1953).
120. Sakato Y., Hashizume T., Kishimoto Y.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* *23*, 269 (1950); *Chem. Abstr.* *45*, 3528h (1951).
121. Blout E. R., Karlson R. H.: *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 941 (1956).
122. Kraml M., Bouthillier L. P.: *Canad. J. Chem.* *33*, 1630 (1955).
123. Borek B. A., Waelsch H.: *J. Biol. Chem.* *205*, 459 (1953).
124. Goldschmidt S., Jutz C.: *Chem. Ber.* *86*, 1116 (1953).
125. Ben Ishai D., Berger A.: *J. Org. Chem.* *17*, 1564 (1952).
126. Katchalski A., Paecht M.: *J. Am. Chem. Soc.* *76*, 6042 (1954).

# INNERMOLEKULARE TRANSPEPTIDIERUNG VON ASPARAGINSÄURE- UND GLUTAMINSÄURE-PEPTIDEN

K. MEDZIHRADESKY

*Institut für organische Chemie, Eötvös-Lorand-Universität, Budapest*

Eines der wichtigsten Probleme bei der Synthese von Peptiden der Amino-dicarbonensäuren ist es, solche Methoden zu finden, bei denen nur das gewünschte strukturisomere Peptid entsteht. Bei den von Acylamino-dicarbonensäureanhydriden ausgehenden Verfahren ist es grundsätzlich möglich, daß beide Isomeren gemeinsam entstehen; überdies hat man jedoch die Bildung beider Isomeren auch bei der Verwendung von Ausgangsverbindungen bemerkt, in welchen nur die eine Carboxylgruppe zur Peptidbildung aktiviert war. In diesen Fällen entstehen die Isomeren entweder während der Knüpfung der Peptidbindung, oder aber es wird das entstehende, zunächst nur das eine Isomere enthaltende Peptid-derivat durch eine sekundäre Reaktion, z. B. bei Verseifung des Peptidesters, zu einem Gemisch von  $\alpha$ - und  $\omega$ -Peptiden isomerisiert. Ein Beispiel für den ersten Fall ist die Beobachtung von Sachs und Brand<sup>1</sup>, daß bei den Peptidsynthesen mit Carbobenzoxy-glutaminsäure- $\gamma$ -azid (*I*) nicht nur das  $\gamma$ -, sondern in wesentlicher Menge auch das  $\alpha$ -Isomere (*III*) entsteht. Bei der Erklärung des Reaktionsmechanismus nehmen sie an, daß vorübergehend ein sogenanntes „Pseudoanhydrid“ (*II*) entsteht, das mit Aminosäureestern unter Bildung des  $\alpha$ -Isomeren (*III*) reagiert.



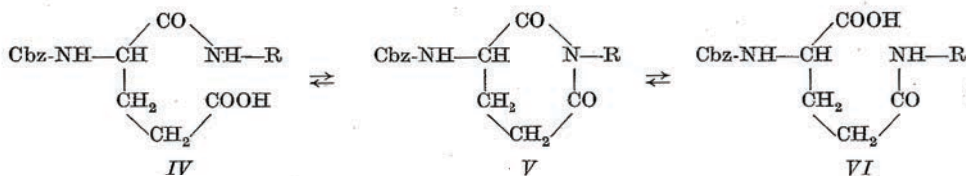
Da die vorübergehende Bildung des Pseudoanhydrids nur eine Hypothese ist, hat man bisher nicht beweisen können, ob so ein Zwischenprodukt unter Spaltung in beiden Richtungen Peptidgemische liefern kann. Es besteht auch die Möglichkeit, daß das  $\gamma$ -Peptid in üblicher Weise durch Reaktion des  $\gamma$ -Azids mit der Aminogruppe, also nicht durch ein Zwischenprodukt entsteht. Man kann sich aber vorstellen, daß das Azid vorübergehend ein Acylglutamin-

säure-anhydrid liefert, dessen Aufspaltung in zwei Richtungen dann das Peptidgemisch gibt.

Ein gutes Beispiel für eine Anomalie der zweiten Gruppe ist die Versuchsserie von Battersby und Robinson<sup>2,3</sup>. Nach ihren Untersuchungen gelangen sie im Laufe der alkalischen Verseifung von Acylasparaginsäure- und Acylglutaminsäure-amid- und -peptidestern zum Gemisch der zwei Isomeren, einerlei, ob sie von dem  $\alpha$ - oder dem  $\gamma$ -Peptid bzw. Amid ausgehen. Dieser Prozeß ermöglicht aus beiden Richtungen die vorübergehende Bildung des entsprechenden Acylaminodicarbonsäure-imids, welches unter geeigneten Bedingungen isolierbar ist. So haben zum Beispiel Sondheimer und Holley<sup>4</sup> im Falle der Carbobenzoxy-asparagin- und -isoasparagin-ester, sowie der entsprechenden Glutaminsäurederivate bei der Verseifung die Imidbildung bemerkt; nach der katalytischen Hydrierung haben sie das Amino-succinimid auch kristallinisch herstellen können.

Cyclische Imide der Glutaminsäurereihe haben wir in unserem Institut als erste schon im Laufe der Jahre 1952—1953 präparativ dargestellt<sup>5</sup>. Es gelang uns, N-acylierte (z. B. carbobenzoxylierte)  $\alpha$ -Glutamylaminosäuren (IV) und  $\gamma$ -Glutamylaminosäuren (VI) durch kurzes Erwärmen mit Essigsäureanhydrid zu den gleichen Imiden (Piperidin-2,6-dion-Derivaten) (V) zu dehydratisieren. Die Imide haben wir kristallinisch isoliert; im Falle des Glutamyl-glycin-Derivats ( $R = -CH_2COOH$ ) konnten wir in diesem Produkt noch eine freie Carboxylgruppe nachweisen, während das Glutamyl-glutaminsäure-Derivat [ $R = -CH(COOH).CH_2.CH_2.COOH$ ] eine cyclische Anhydrid-Gruppe enthält<sup>6</sup>.

Die Imide lösen sich bei Raumtemperatur leicht in 1N Alkalihydroxyd-Lösung; nach dem Ansäuern läßt sich ein Gemisch der Ausgangspeptide aus der Lösung isolieren. Die papierchromatographische Untersuchung der freien Peptide zeigte, daß in diesem Gemisch das  $\gamma$ -Peptid stark vorwiegt.



Später haben auch King und Mitarbeiter aus den Phthalyl- $\gamma$ -glutamylpeptiden ähnliche Imide hergestellt<sup>7</sup>.

Eine ganz analoge Untersuchungsreihe stellten wir auch mit den Asparaginsäurederivaten an<sup>8</sup>. Wir haben die Carbobenzoxy-asparagylpeptide und aus ihnen, ähnlich wie bei den Glutamylsäurederivaten, durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid die Imide hergestellt. Bei der Aufspaltung mit verdünnter Natronlauge gelangten wir auch hier zu einem Peptidgemisch.

Diese bei den Aminodicarbonsäure-derivaten gefundene Umwandlung bezeichnen wir<sup>6</sup> als reversible, innermolekulare  $\alpha \rightleftharpoons \omega$  *Transpeptidierung*.

Später haben wir diese Transpeptidierungsversuche auch auf Polypeptide von hohem Molekulargewicht ausgedehnt<sup>9</sup>. Als Modellsbstanzten wurden die synthetische  $\alpha$ -Polyglutaminsäure und die natürliche  $\gamma$ -Polyglutaminsäure aus *Bacillus subtilis* verwendet. Die Polyglutaminsäuren wurden in Dimethylformamid-Lösung mit einem großen Überschuß von Essigsäureanhydrid

längere Zeit auf etwa 120° erwärmt. Die ausgeschiedenen Anhydropolyglutaminsäuren lösen sich nicht in Natriumbicarbonat-Lösung, man kann sie aber in 0,5N Natronlauge bei Zimmertemperatur in einigen Minuten auflösen und aus der neutralisierten Lösung lassen sich dann über ihre schwerlöslichen Kupfer(II)-salze Poly-glutaminsäuren isolieren, die — unabhängig davon, ob sie von der  $\alpha$ -Polyglutaminsäure oder  $\gamma$ -Polyglutaminsäure herrühren — einander äußerst ähnlich sind. Sie sind in Wasser sehr leicht löslich und zeigen eine blaustichige Biuretreaktion. Vergleichshalber sei bemerkt, daß die  $\alpha$ -Polyglutaminsäure, die sich in Wasser nur sehr spärlich löst, eine rein violette Biuretreaktion zeigt, während die in Wasser leicht lösliche  $\gamma$ -Polyglutaminsäure biuretnegativ ist. Es sei auch erwähnt, daß die synthetische  $\alpha,\gamma$ -Polyglutaminsäure, in deren Peptidkette  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutamylreste laufend abwechseln, ebenfalls eine blaustichige Biuretreaktion zeigt. All dieses ließ darauf schließen, daß diese Polyglutaminsäuren beide Bindungstypen enthalten, d. h. daß ein Teil ihrer Bindungen sich umwandeln bzw. innermolekular transpeptidieren ließ. Den gemischten Bindungstyp haben wir durch spezifische Abbaureaktionen beweisen können. Die Menge der Abbauprodukte ließ darauf schließen, daß in den abgebauten transpeptidierten Polyglutaminsäuren  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutamylreste in nahezu gleicher Menge vorhanden sein dürften.

Die Anhydratisierung der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Polyglutaminsäuren findet nicht gleich leicht statt. Beim Erwägen der beiden Strukturen wird es offenbar, daß die Carboxylgruppen der  $\alpha$ -Polyglutaminsäure verhältnismäßig leicht und oft der Peptidkette nahe kommen, während die Anhydratisierung der  $\gamma$ -Polyglutaminsäure nur bei genügender Deformation der ganzen Kette erfolgen kann. Die verschiedene Reaktionsfähigkeit offenbart sich in der längeren Anhydratisierungszeit und den schlechteren Ausbeuten bei der  $\gamma$ -Polyglutaminsäure.

Bei der Anhydratisierung in Peptidbindungen geschlossener  $\alpha$ -Glutamylreste kann man grundsätzlich nicht nur mit Ausbildung des sechsgliedrigen Imid-rings, sondern auch des fünfgliedrigen Pyrrolidon-rings rechnen. Clayton, Kenner und Sheppard<sup>10</sup> haben z. B. im Falle eines Tetrapeptid-derivats, in welchem Phenylalanin einem  $\alpha$ -Glutamylrest folgt, nur die Bildung des Pyrrolidon-rings beobachten können, wenn die Verbindung mit Thionylchlorid behandelt wird. Man kann sich wohl vorstellen, daß der sterische Effekt der naheliegenden Seitenketten während der Ausbildung des Rings zur Geltung kommt. Dies wird auch durch den Befund unterstützt, daß bei der Carbo-benzoxy- $\alpha$ -glutamylglutaminsäure nur die Ausbildung des Piperidin-2,6-dion-Rings beobachtet wurde, während die aus der  $\alpha$ -Polyglutaminsäure gewonnene Anhydropolyglutaminsäure neben sechsgliedrigen Ringen auch fünfgliedrige enthält. Die  $\gamma$ -Polyglutaminsäure läßt sich ihrer Struktur gemäß nur unter Bildung von sechsgliedrigen Ringen anhydratisieren. Dieser Unterschied äußert sich auch in der Ausbeute an transpeptidierten Polyglutaminsäuren; die aus  $\alpha$ -Polyglutaminsäure erhaltene Anhydropolyglutaminsäure liefert nur relativ wenig transpeptidierte Polyglutaminsäure von hohem Molekulargewicht, da an den Pyrrolidon-ringen durch die verdünnte Natronlauge eine wesentliche Kettenaufspaltung eintritt.

Die Anhydropolyasparaginsäure war aus der  $\alpha$ -Polyasparaginsäure mittels Essigsäureanhydrid nur schwer herzustellen. Wir gebrauchten darum zu den Transpeptidierungsversuchen eine durch längeres Erhitzen in Tetralin erhaltene

Anhydropolyasparaginsäure. In der transpeptidierten Polyasparaginsäure wurde ungefähr die gleiche Anzahl von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asparagylbindungen festgestellt.

Von dem Standpunkt der eindeutigen Synthese von Glutaminsäure- und Asparaginsäure-peptiden ist es notwendig, die Gefahr der Transpeptidierung nach Möglichkeit auszuschließen. Nach Battersby und Robinson<sup>3</sup> kann Transpeptidierung immer dann eintreten, wenn Ester von Acylamino-dicarbonsäurepeptiden bzw. -amiden verseift werden. Manchmal kann man jedoch diese Nebenreaktion vermeiden; wird z. B. die Hydrolyse des  $\alpha$ -Polyglutaminsäure-polymethylesteres mit 0,5N Natronlauge in Gegenwart von frisch gefälltem Kupfer(II)-hydroxyd durchgeführt, dann kann man infolge der Schutzwirkung des Biuretkomplexes sowohl die Transpeptidierung, als auch die Racemisierung fast gänzlich zurückdrängen<sup>11</sup>. Die so erhaltene  $\alpha$ -Polyglutaminsäure enthält in der Tat keine nachweisbaren  $\gamma$ -Glutamylbindungen, und liefert nach der Totalhydrolyse Glutaminsäure guter optischer Aktivität.

Die Racemisierung und die Transpeptidierung sind zwei miteinander eng verknüpfte Erscheinungen; beide sind mit der Enolisierung der Carbonylgruppe verbunden. Wenn wir mit der Ausbildung des Biuretkomplexes die Tautomerisierung zur Iminohydrin-Form begünstigen, beseitigen wir im gleichen Maße die Möglichkeit sowohl der Racemisierung als auch der Transpeptidierung. Wir möchten die Berechtigung dieser Annahme in unserem Institut an Peptidmodellen von kleinerem Molekulargewicht überprüfen.

Man dürfte annehmen, daß sich eine innermolekulare Transpeptidierung, in welche Asparagyl- und Glutamylreste einbezogen werden, auch bei natürlichen Polypeptiden und vielleicht auch unter physiologischen Bedingungen abspielen kann.

#### Literatur

1. Sachs H., Brand E.: J. Am. Chem. Soc. 76, 1815 (1954).
2. Battersby A. R., Robinson J. C.: Chem. & Ind. (London) 1945, 45.
3. Battersby A. R., Robinson J. C.: J. Chem. Soc. 1955, 259.
4. Sondheimer E., Holley R. W.: J. Am. Chem. Soc. 76, 2467 (1954).
5. Medzihradzsky K.: erörtert in einem Vortrag von Bruckner V., Kovács J.: Magyar Tudományos Akad., Kém. Tudományok Osztályának, közleményei 3, 105 (1953).
6. Kovács J., Medzihradzsky K., Bruckner V.: Naturwiss. 41, 450 (1954); Kovács J., Medzihradzsky K., Bruckner V.: Acta Chim. Hung. 6, 183 (1955).
7. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R., Swidlin W. A.: J. Chem. Soc. 1957, 873.
8. Kovács J., Könyves I., Császár J.: Im Druck.
9. Bruckner V., Kovács J., Medzihradzsky K.: Naturwiss. 42, 96 (1955).
10. Clayton D. W., Kenner G. W., Sheppard R. C.: J. Chem. Soc. 1956, 371.
11. Bruckner V., Kovács J., Kovács K., Kótai A.: Acta Chim. Hung. 5, 267 (1955).

## Discussion

on the papers presented by J. RUDINGER and K. MEDZIHRADSKY

YOUNG: We have continued our work on the synthesis of peptides of glutamic acid and aspartic acid, and I would like, if I may, to discuss some of the results. The  $\gamma$ -L-glutamyl-L-aspartic acid which we synthesised through the  $\gamma$ -azide of benzyloxycarbonylglutamic acid [J. Chem. Soc. 1950, 1959; Biochem. J. 65, 516 (1957)] contained some  $\alpha$ -isomer, and this was clearly due to our inability to crystallise the intermediates after coupling. We have subsequently attempted to synthesise this dipeptide by other routes. Diethyl and dibenzyl aspartate failed to react satisfactorily with N-tosyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid, even under vigorous conditions. An attempt through  $\alpha$ -benzyl benzyloxycarbonyl-L-glutamate, prepared by Sachs and Brand's procedure [J. Am. Chem. Soc. 75, 4610 (1953)], failed because we were unable to satisfy ourselves as to the purity of this intermediate, and finally Mr. R. J. Wilkinson has been using the reaction between phthaloyl-L-glutamic anhydride and dibenzyl L-aspartate and this appears likely to be successful. Nonetheless, we found a little  $\alpha$ -isomer after coupling, and we had great difficulty in purification at each stage; for this purpose, the salts with dicyclohexylamine and with benzhydrylamine were valuable.

We have used  $\beta$ -benzyl benzyloxycarbonyl-L-aspartate as the starting point for the synthesis of several  $\alpha$ -aspartyl peptides, including  $\alpha$ -L-aspartyl-L-leucine,  $\alpha$ -L-aspartyl-L-aspartic acid, and  $\alpha$ -L-aspartyl-L-glutamic acid, the first being new. In the first case, we used both the carbonic mixed anhydride and the ethylene phosphorochloridite methods (amide procedure) of coupling, but in the subsequent cases we found dicyclohexylcarbodiimide most satisfactory. The condensations were effected with the benzyl esters of the amino-acids, and hydrogenation gave chromatographically and electrophoretically pure peptides. We found it important to avoid heating the peptides in the presence of mineral acid, as otherwise some imide was formed, which it proved impossible to remove by crystallisation.

We have found that partial hydrolysis, by hydrogen iodide in acetic acid, of dibenzyl L-aspartate affords a useful preparation of  $\alpha$ -benzyl-L-aspartate (37% yield), analogous to that developed by Sachs and Brand [loc. cit.] for  $\alpha$ -benzyl L-glutamate. Hence we obtained  $\alpha$ -benzyl benzyloxycarbonyl-L-aspartate, which previously had been prepared only by fractionation of the isomers formed when benzyloxycarbonyl-L-aspartic anhydride reacts with benzyl alcohol [Bergmann M., Zervas L., Salzmann L.: Ber. 66, 1288 (1933); Miller G. H., Behrens K., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. 140, 411 (1941)]. This intermediate was then condensed by means of dicyclohexylcarbodiimide with the benzyl esters of aspartic and glutamic acid, after which hydrogenation yielded  $\beta$ -L-aspartyl-L-aspartic acid and  $\beta$ -L-aspartyl-L-glutamic acid. The former is new, and the latter had previously been obtained only in small amount from benzyloxycarbonyl-L-aspartic anhydride [J. Chem. Soc. 1952, 24].

Very recently, Shiba, Yamakito, and Kaneko [J. Inst. Polytechnics, Osaka City Univ., Ser. C. 5, 144 (1956)], have reported a repetition of our synthesis of  $\alpha$ -L-aspartyl-L-glutamic acid, by the anhydride route, separating the isomers by fractional extraction with sodium carbonate. They found  $[\alpha]_D^{19} - 3.6^\circ$  (*c* 3.90 in water) for their dipeptide, whereas we reported  $[\alpha]_D^{25} + 5.6^\circ$  (*c* 3.39 in water). We were therefore glad of the opportunity which our new synthesis gave us to prepare this dipeptide by an entirely different route. We find for this product  $[\alpha]_D^{18} + 6.3^\circ$  (*c* 5.0 in water), and since the  $\beta$ -isomer has  $[\alpha]_D^{18} - 10.5^\circ$  (*c* 5.25 in water), it seems likely that Shiba, Yamakito, and Kaneko's separation of the isomers was incomplete.

Mr. R. H. Moore, Miss P. J. E. Pimlott, and Miss P. M. Bryant have been associated with the above syntheses of aspartyl peptides.

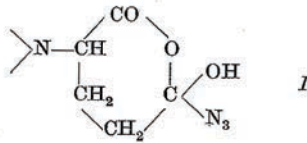
WÜNSCH: We have found recently that carbobenzoxyglutamic acid  $\alpha$ -thiophenyl ester [Wieland T., Weidenmüller H.: Ann. 597, 111 (1955)] is a good starting material for the preparation of  $\alpha$ -glutamyl-aspartic acid — the carbobenzoxy-dipeptide can be prepared from the thiophenyl ester and aspartic acid with good results.

WIELAND: Ich möchte noch einmal das Augenmerk auf die Umlagerung von aktivierten Glutaminsäureverbindungen richten. Es wurde von einem Pseudoanhydrid gesprochen — was hat man darunter zu verstehen? Also das  $\alpha$ -Azid der Carbobenzoxy-glutaminsäure lagert sich in das  $\gamma$ -Azid um und umgekehrt. Es stellt sich anscheinend ein Gleichgewicht ein. Wie hat man diese Reaktion zu formulieren? Herr Rudinger, Sie sind vielleicht hier kompetent.

## Discussion

RUDINGER: Man nimmt an, daß bei den Ester-chloriden der Acylglutaminsäuren *a priori* die Möglichkeit der Umesterung besteht und man zitiert Beispiele aus der Glutarsäure- und Phthalsäurechemie. Im gegebenen Falle, bei dem Azid mit der freien COOH-Gruppe, würde man eher als Zwischenprodukt das cyclische Anhydrid erwarten. Bei den Estern wäre es das Pseudoanhydrid. Das hat, denke ich, Dr. Medzihradzky auch gesagt, er glaubt auch, es sei hier das symmetrische Anhydrid.

MEDZIHRAZSKY: Aus dem  $\gamma$ -Azid könnte auch die Verbindung I entstehen, und der pseudoanhydrid-artige Ring könnte sich in beiden Richtungen öffnen. Wie ich schon gesagt habe, ist



dieses nur eine Hypothese von Sachs und Brand.

RUDINGER: Dann würde aber durch Ringaufspaltung das  $\gamma$ -Azid des  $\alpha$ -Peptides entstehen, und daraus eventuell das Bis-derivat.

WIELAND: Wenn ein echtes Anhydrid als Zwischenprodukt auftritt, müßte man verlangen, daß sich das mit Azidionen aufspalten läßt; ist das gemacht worden?

RUDINGER: Herr Zaoral hat das Phthalylglutaminsäureanhydrid mit Azoimid zu  $\alpha$ -Phthalyl-diaminobuttersäure abgebaut; da muß also das  $\gamma$ -Azid als Zwischenprodukt entstehen. Es ist auch bei dem Bernsteinsäureanhydrid bekannt, dort ist es zum Abbau der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindung zu  $\beta$ -Alanin benützt worden [Phares E. F., Long M. V.: J. Am. Chem. Soc. 77, 2556 (1955)]; man kann also cyclische Anhydride mit Azoimid öffnen.

WIELAND: Ich darf vielleicht noch ein Wort zu den Thiophenylestern der substituierten Glutaminsäuren sagen. Wenn man das Carbobenzoxy-glutaminsäure-anhydrid mit Thiophenol umsetzt, dann hängt es von der Natur der Base ab, ob mehr  $\alpha$ - oder mehr  $\gamma$ -Thiophenylverbindung entsteht. In Gegenwart starker Basen entsteht mehr von der  $\gamma$ -Verbindung, in Pyridin entstehen ungefähr gleichviel  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Thiophenylester. Wenn man reinen  $\gamma$ -Thiophenylester, oder reinen  $\alpha$ -Thiophenylester in Pyridin-Wasser eine Zeitlang aufbewahrt, so erhält man nach Befunden von Fr. Dr. Heinke ein Gleichgewichtsgemisch. Dieses ist in seiner Zusammensetzung von der Natur des Lösungsmittels abhängig. In triäthylamin-haltigen Lösungsmitteln liegt das Gleichgewicht zugunsten der  $\gamma$ -Verbindung, in Pyridin zugunsten der  $\alpha$ -Verbindung. Ich glaube also ganz allgemein, daß alle aktivierten Glutaminsäurederivate in der Lage sind, sich über ein Gleichgewicht zu isomerisieren und daran muß man natürlich immer denken. Wenn man Glück hat, wird die eine Form vorwiegend gebildet.

RUDINGER: Das ist eine Frage, die die Sache noch weiter kompliziert: daß man nämlich neben den zwei Mechanismen der Ringspaltung außerdem noch ein Resultat haben kann das rein kinetisch entschieden ist, oder eines das thermodynamisch bestimmt ist, je nachdem, wie schnell die Reaktionen stattfinden. Leider sind die Acylamino-dicarbonensäuren doch noch etwas zu komplizierte Modelle, um wirklich eindeutige mechanistische Schlüsse zu erlauben; wenn man andererseits einfachere Modelle gebraucht, wie z. B.  $\alpha$ -Phenylglutarsäure, dann sind die Resultate wieder von der peptidsynthetischen Praxis einigermaßen entfernt.

WIELAND: Ich glaube, es wird das beste sein, daß man die Carboxylgruppe, die nicht reagieren soll, als Ester schützt, wie Sie es auch gesagt haben.

WÜNSCH: Zur Frage der Diaminosäuren: Man kann die  $\epsilon$ -Aminogruppe im Falle des Lysins verhältnismäßig leicht über den Kupferkomplex als Benzylidenderivat schützen. Wenn man den Kupferkomplex dann mit Natriumsulfid oder mit Natronlauge-Schwefelwasserstoff zersetzt, kommt man zur  $\epsilon$ -Benzyliden-lysin-natrium-Verbindungen. Diese kann man dann in  $\alpha$ -Stellung carbobenzoxylieren oder tosylieren. Beim nachfolgenden Ansäuern wird die Benzylidenverbindung zerstört, und man erhält so die reinen  $\alpha$ -Acylverbindungen der Diaminosäuren. Ich weiß nicht, ob diese Methode bei allen Diaminosäuren mit Erfolg angewandt werden kann. Bei der Diaminopropionsäure wird dies mit Sicherheit zu verneinen sein, weil sie ja nicht nur einen  $\alpha$ -Komplex, sondern teilweise einen  $\beta$ -Kupferkomplex gibt.

RUSSELL: In synthesizing hypertensin [Elliott D. F., Peart W. S.: Biochem. J. 65, 246 (1957)] we had the problem of preparing a peptide with L- $\alpha$ -aspartyl-L-arginine at the N-terminus. As protection for the  $\beta$ -carboxyl group we used a benzyl ester, which could be removed by hydrolysis, so avoiding alkaline saponification which is known to produce isomerization. The

### *Diamino- and Dicarboxylic Acids*

presence of the  $\beta$ -ester made it necessary to couple with free arginine rather than its ester, since the arginine carboxyl was to be further coupled.

Benzyloxycarbonyl-L-aspartic acid  $\beta$ -benzyl ester was prepared by a modification of the published method [Berger A., Katchalski E.: *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4084 (1951)]. An attempted coupling with L-arginine using the mixed anhydride method gave a product which was not the required acyl dipeptide. This was not investigated further since the carbodiimide-nitrophenol route gave the expected product in 50% yield.

Since it had been reported that the asparagine analogue of hypertensin II [Rittel W., Iselin B., Kappeler H., Riniker B., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* **40**, 614 (1957)] was also a potent hypertensive agent, we were interested in preparing the analogous dipeptide containing L-asparagine. Benzyloxycarbonyl-L-asparagine was condensed with L-arginine as before; the product was a mixture of two substances. Gish et al. [*J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5954 (1956)] had also reported anomalous results when preparing asparagine peptides. We therefore attempted to convert the dipeptide  $\beta$ -benzyl ester to the asparagine analogue by ammonolysis. When the benzyloxycarbonyl-dipeptide  $\beta$ -benzyl ester was treated with methanolic ammonia, two products were again obtained, presumably the asparagine and isoasparagine compounds.

When, however, the  $\beta$ -benzyl ester was treated with liquid ammonia, a quantitative yield of a single substance was obtained. Its identity was confirmed by digestion with basic carboxypeptidase of which a sample was kindly given to us by Dr. J. E. Folk [*J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3541 (1956)]. This enzyme liberated benzyloxycarbonyl-L-asparagine, identified by paper chromatography and mixed melting point with authentic material.

This simple and apparently unequivocal route to both  $\alpha$ -aspartyl and asparaginyl peptides may be particularly useful in comparative studies where both are required.

The reaction of either of these dipeptides with L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucine benzyl ester using carbodiimide, followed by removal of the protecting groups, gave a product having the characteristic pharmacological action of hypertensin.

Biological assay of the crude material\* showed that the yield in the final coupling was of the order of 1-2%. Similar low yields were reported by other workers using nitroarginine [Rittel et al., *loc. cit.*; Schwarz H., Bumpus F. M., Page I. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5697 (1957)] in place of unprotected arginine. Recently Schwyzer and his co-workers [*Helv. Chim. Acta* **41**, 1273 (1958)] have reported greatly improved yields, and we are at present investigating the coupling of benzyloxycarbonyl-L- $\alpha$ -aspartyl-nitro-L-arginine  $\beta$ -benzyl ester with the octapeptide benzyl ester.

\* We wish to thank Prof. W. S. Peart for the pharmacological testing.

## THE SYNTHESIS OF PEPTIDES CONTAINING CYSTEINE: SPECIAL PROBLEMS

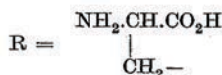
G. T. YOUNG


*The Dyson Perrins Laboratory, University of Oxford*

I do not propose to recount here the classical work which led first to the synthesis of glutathione<sup>1</sup> and lately to the syntheses of oxytocin<sup>2</sup>, lysine-vasopressin<sup>3</sup>, and arginine-vasopressin<sup>4</sup>, but it may be helpful to initiate our discussion by a simple enumeration of the methods which have been used for the protection of the thiol group of cysteine during peptide synthesis, with a reminder of some of the difficulties encountered, and I would like to conclude by describing a new method of protection which may, I hope, prove useful.

Of the procedures shown in Table I, the first two are of course well established. Peptides of cystine are often more difficult to handle than the corresponding S-benzyl derivatives of cysteine, which are usually preferred, and it is by means of this protecting group that most of the known peptides of cysteine, including the precursors of oxytocin and the vasopressins, have been syntheses-

Table I  
Methods for the Protection of Thiol-Groups during Synthesis



Protected Compound	Removal Agent	Ref.
RS.SR	PH <sub>4</sub> I-AcOH; Na-liq. NH <sub>3</sub>	1 26
RS.CH <sub>2</sub> Ph	Na-liq. NH <sub>3</sub>	5
RS.CH <sub>2</sub> .C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> .NO <sub>2</sub> -p	H <sub>2</sub> -Pd/C	15
RS.CPh <sub>3</sub>	HCl in CHCl <sub>3</sub>	7
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}\text{CO}_2\text{H} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C}\text{Me}_2 \end{array}$	dil. acid; HgCl <sub>2</sub>	6 9,10
RS.CO.O.CH <sub>2</sub> Ph	conc. NH <sub>4</sub> OH; HBr-AcOH Na-liq. NH <sub>3</sub>	11
RS.SPh	6N-HCl; CH <sub>2</sub> (SH).CO <sub>2</sub> Et	12
RS- 	dil. acid; AgNO <sub>3</sub>	27a

<sup>a</sup> Added to the script.

ised. The debenzoylation by sodium in liquid ammonia<sup>5</sup> is sometimes inconvenient, however, and the yields at this final stage of the glutathione syntheses have been low (14—40%; summarised in reference<sup>6</sup>).

S-Trityl has been used in successful syntheses of glutathione<sup>7</sup> and of oxytocin<sup>8</sup> and it will be interesting to hear of other workers' experience with this group. The formation of the 2,2-dimethylthiazolidine for thiol-protection, in conjunction with the use of the formyl group for amino-protection<sup>6,9,10</sup>, has led to syntheses of glutathione<sup>6</sup> and of dipeptides containing cysteine<sup>10</sup>; King, Clark-Lewis and Wade suggest<sup>6</sup> that the more stable 2-phenylthiazolidine may be preferable. S-Benzoyloxycarbonylation<sup>11</sup> and S-thiophenylation<sup>12</sup> have been used in the special case of the preparation of poly-L-cysteine. Thiol-protection is not always essential before the N-acylation of cysteine, since, as Wieland has shown, the acyl group will migrate from the sulphur to the nitrogen<sup>13</sup>. The possibility of such a rearrangement must always be borne in mind.

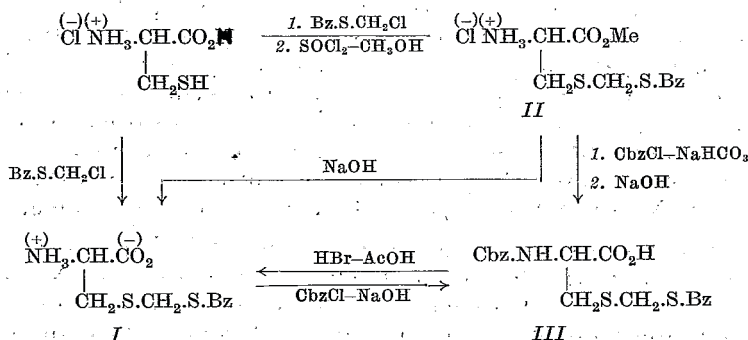
Although cystine can be reduced to cysteine catalytically<sup>14</sup>, platinum and palladium catalysts are usually inactive in such reactions, and it was of course for this reason that Harington and Mead<sup>1</sup> used phosphonium iodide in acetic acid to remove the benzyloxycarbonyl group in their synthesis of glutathione. It has now been reported<sup>15</sup> that *p*-nitrobenzyloxycarbonyl groups may be removed from cystine by hydrogenation in the presence of palladium on carbon, and several peptides of cystine have been prepared by this means. It is interesting to note that S-*p*-nitrobenzylcysteine can similarly be reduced to cysteine. Normally, however, amino-protection during the synthesis of peptides of cysteine has been by benzyloxycarbonyl itself, and removal has been effected by sodium in liquid ammonia or by hydrogen bromide in acetic acid. N-Tosylation has also proved valuable, particularly in syntheses of oxytocin<sup>16</sup> and the vasopressins<sup>3,4</sup>, N-tosyl-S-benzylcysteinyl chloride being crystalline.

Mention should be made here of certain difficulties which have been encountered during recent work, due to the lability of derivatives of N-benzyloxycarbonyl-S-benzylcysteine. In their synthesis of lysine-vasopressin, du Vigneaud, Bartlett and Jöhl<sup>3</sup> observed the formation of benzyl mercaptan during the saponification of N-benzyloxycarbonyl-S-benzylcysteinyltyrosine ethyl ester; the N-tosyl analogue was however stable. Maclaren, Savige, and Swan<sup>17</sup> have reported an analogous decomposition during the conversion of the esters of N-benzyloxycarbonyl-S-benzylcysteinylglycine and N-tosyl-S-benzylcysteine to their hydrazides; these reactions are apparently hindered, and when in the former case the temperature was raised to 80° benzyl mercaptan was formed. In the latter case the reaction was effected at 37°, but much racemisation occurred. There is indeed an unusual tendency to racemisation in such derivatives; the phenacetylation of S-benzyl-L-cysteine<sup>18</sup> gave an early example, and Iselin, Feurer, and Schwyzer<sup>19</sup> have reported that the normal conditions for the formation of the cyanomethyl ester of N-benzyloxycarbonyl-S-benzylcysteine yield partially racemised product; a fully active product was obtained when the reaction was carried out at room temperature. It is clearly more important than ever that the optical purity of derivatives of cysteine should be carefully established. Since the azide method of coupling appears least likely to cause racemisation<sup>20</sup>, it is particularly unfortunate that not only is the preparation of these hydrazides troublesome but also the azides themselves may be exceptionally unstable, decomposing to give the amide, as in the

case of N-benzyloxycarbonyl-S-benzylcysteiny azide<sup>17,21</sup>. Nonetheless, Maclaren, Savige, and Swan prefer the azide route to others.

Finally, I should like to mention a new thiol-protecting group which Miss P. J. E. Pimlott and I have developed<sup>22</sup>, and which we hope may have certain advantages over the classical methods, particularly in the mildness of the conditions required for its removal. The method depends on the reaction of benzylthiomethyl chloride with the thiol to form a mercaptal<sup>23</sup>; such mercaptals are very stable, but are smoothly cleaved by mercuric chloride to give the mercaptide, from which the thiol may readily be regenerated.

In our initial experiments, we caused benzylthiomethyl chloride<sup>24</sup> to react with L-cysteine hydrochloride in dried methanol; this yields a mixture of the hydrochloride of S-benzylthiomethyl-L-cysteine (*I*) with the corresponding methyl ester hydrochloride (*II*). This crude mixture may either be hydrolysed by alkali to give S-benzylthiomethyl-L-cysteine in 70% overall yield, or it may be completely esterified by Brenner and Huber's method (by thionyl chloride and methanol)<sup>25</sup>, with an overall yield of 85%. More recently, we have found that *I* may advantageously be prepared by reducing L-cystine with sodium in liquid ammonia, and adding benzylthiomethyl chloride to the resulting solution.



N-Benzyloxycarbonyl-S-benzylthiomethyl-L-cysteine (*III*) may be obtained in the usual way from *I*, and it is conveniently isolated as its crystalline dicyclohexylamine salt; it may also be obtained by benzyloxycarbonylation of the ester *II*, followed by saponification.

The protecting group was removed by dissolving S-benzylthiomethyl-L-cysteine in warm 1N hydrochloric acid, and adding warm aqueous mercuric chloride. Mercury benzyl sulphide precipitated immediately, while the mercury derivative of cysteine remained in solution.

Hydrogen sulphide regenerated cysteine, which on oxidation with hydrogen peroxide yielded L-cystine of  $[\alpha]^{16.5} = -230^\circ$  in 1N hydrochloric acid, in agreement with the figure obtained by extrapolation of Toennies and Lavine's equation<sup>26</sup>. Protection and recovery of the thiol had therefore been effected without any loss of activity. Further, when the N-benzyloxycarbonyl-S-benzylthiomethyl-L-cysteine obtained from the ester *II* was treated with hydrogen bromide in acetic acid, authentic S-benzylthiomethyl-L-cysteine was obtained, and hence no racemisation had occurred during this sequence of reactions.

We have examined the chemical stability of S-benzylthiomethyl-L-cysteine

under some of the conditions likely to be encountered during peptide synthesis, and the protecting group appears to be completely stable. The starting material was recovered unchanged after treatment with 2N sodium hydroxide at room temperature for 24 hours, or with 2N hydrochloric acid at 60° for 5 hours, or with 2N hydrogen bromide in acetic acid at room temperature for 15 hours; in each case the nitroprusside test was negative after the experiment.

We feel that N-benzyloxycarbonyl-S-benzylthiomethyl-L-cysteine and S-benzylthiomethyl-L-cysteine methyl ester hydrochloride should prove valuable starting points for the synthesis of peptides containing cysteine, and we are now obtaining experience in their use. This method of protection should be especially helpful where the use of sodium in liquid ammonia is undesirable.

#### References

1. Harington C. R., Mead T. H.: *Biochem. J.* 29, 1602 (1935).
2. Du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3115 (1954).
3. Du Vigneaud V., Bartlett M. F., Jöhl A.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5572 (1957).
4. Du Vigneaud V., Gish D. T., Katsyannis P. G., Hess G. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3355 (1958).
5. Wood J. L., du Vigneaud V.: *J. Biol. Chem.* 130, 109 (1939).
6. King F. E., Clark-Lewis J. W., Wade R.: *J. Chem. Soc.* 1957, 880.
7. Amiard G., Heymès R., Velluz L.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 698.
8. Velluz L., Amiard G., Bartos J., Goffinet B., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1956, 1464.
9. Sheehan J. C., Armstrong W. A.: *122nd Meeting Am. Chem. Soc. 1952*, Abstr. No. 23, p. 15 M.
10. Sheehan J. C., Yang D. D. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1158 (1958).
11. Berger A., Noguchi J., Katchalski E.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4483 (1956).
12. Sakakibara S., Tani H.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 85, 29 (1956).
13. Wieland T., Bokelmann E., Bauer L., Lang H. U., Lau H.: *Ann.* 583, 129 (1953).
14. Bergmann M., Michalis G.: *Ber.* 63, 987 (1930).
15. Berse C., Boucher T., Piché L.: *J. Org. Chem.* 22, 805 (1957).
16. Honzl J., Rudinger J.: *This Journal* 20, 1190 (1955).
17. Maclaren J. A., Savige W. E., Swan J. M.: *Proc. Intern. Wool Textile Research Conf., Australia, 1955*, Vol. C, p. 164.
18. King L. C., Suydam F. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5499 (1952).
19. Iselin B., Feurer M., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 38, 1508 (1955).
20. Young G. T.: *This Journal* 24, 39 (1959).
21. Hegedüs B.: *Helv. Chim. Acta* 31, 737 (1948).
22. Pimlott P. J. E., Young G. T.: *Proc. Chem. Soc.* 1958, 257.
23. Böhme H., Fischer H., Frank R.: *Ann.* 54, 563 (1949).
24. Wood J. L., du Vigneaud V.: *J. Biol. Chem.* 131, 267 (1939).
25. Brenner M., Huber W.: *Helv. Chim. Acta* 36, 1109 (1953).
26. Toennies G., Lavine T. F.: *J. Biol. Chem.* 79, 153 (1930).
27. Du Vigneaud V., Audrieth L. I., Loring H. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 52, 4500 (1930).
28. Holland G. I., Cohen L. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3765 (1958).

## Discussion

on the paper presented by G. T. YOUNG

BRENNER: You did not collect any experience with the use of this group in actual peptide synthesis, did you?

YOUNG: We have actually prepared a couple of peptides with this protecting group, and it seems to survive the carbodiimide method of coupling very well, but we are continuing.

BRENNER: Is this new derivative more optically stable under alkaline conditions than S-benzylcysteine?

YOUNG: No. I could put forward a tentative suggestion as to why S-benzyl derivatives of cysteine may racemise in alkali, but from this point of view benzylthiomethyl derivatives would be similar. One could suggest that the anion *I* may be stabilised by resonance with the contributing form *II*, so making the  $\alpha$ -hydrogen labile.



WICHTERLE: This involves a type of hyperconjugation?

YOUNG: Yes, there is no bond between the carbon and sulphur in structure *II*.

RUDINGER: Swan suggests that the racemisation of S-benzylcysteine just proceeds by elimination and re-addition of benzyl mercaptan, and what Dr Young has written is really the incipient form of that same reaction.

YOUNG: Yes, I myself feel reluctant to postulate elimination and recombination to explain racemisation, as it seems unlikely that recombination would be so complete.

BRENNER: Free cysteine, that is, with free SH is a little more stable, isn't it. In a basic medium, you would already have a charge on the sulphur. This would be in line with your results, because resonance form *II* would be very much more unstable, it would have two charges on sulphur.

RUDINGER: Well, I think that for the case of cystine it has been fairly well established that you get the acrylate with strong alkali [Swan J. M.: Nature 179, 965 (1957)]; that is the way the thioether derivatives are formed in wool.

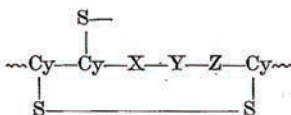
BRENNER: But which would be more stable in a peptide, benzylcysteine or free cysteine?

RUDINGER: S-Benzylcysteine — to most conditions normally encountered, I should think.

BRENNER: How about racemisation?

RUDINGER: I don't know; hardly anyone has worked with free cysteine in the operations of peptide synthesis.

WÜNSCH: A new method for protecting sulphhydryl has just been described [Holland G. F., Cohen L. A.: J. Am. Chem. Soc. 80, 3765 (1958)], by conversion to 2-tetrahydropyranyl thioethers. The authors have in mind the synthesis of the structure.



of the insulin A-chain using a combination of sulphur protecting groups.

The S-tetrahydropyranyl derivatives were prepared by adding dihydropyran to cysteine methyl ester or carbobenzoxy-cysteine. The protecting group is easily cleaved by silver ions at 0°

*Peptides Containing Sulphur*

to give the free sulphhydryl compound (as the mercaptide) and  $\delta$ -hydroxyvaleraldehyde. It is very interesting to note that the tetrahydropyranyl thioethers are stable during sodium-liquid ammonia reduction of the carbobenzoxy function.

YOUNG: One slight disadvantage of this method will be that you get an extra asymmetric centre.

WÜNSCH: Yes, that is the same as with Schwyzer's tetrahydropyranyltirosine etc.

YOUNG: Is it not also the case that these ethers are unstable to acid?

WÜNSCH: The cysteine derivative is stable to acid.

ROTHE: Herr Dr. Young, unter welchen Bedingungen findet der Umsatz des Cysteins mit dem Benzyl-chlormethylsulfid statt?

YOUNG: In the minimum amount of methanol, on the boiling water-bath for 30 minutes.

RUSSELL: I think it is true to say that nobody has yet prepared peptides of cystine where two peptide chains are joined together only by disulphide bridges. If you think about this problem — at some point in the synthesis you must join two chains which you have synthesised together. In the case of insulin, if you oxidise the A and B chains in a mixture I believe it is true to say that they go together the wrong way round. And in more complicated cases it may well be that it will prove impossible to oxidise two peptide chains together to form disulphide bonds in the right way. A possible solution to this problem would be the preparation of cystine derivatives with four different protecting groups, each capable of being selectively removed. I think at the moment this is rather a difficult problem in that we have not got protecting groups which we can remove from carboxyl and amino groups in completely selective fashion.

RUDINGER: Fairly recently, the monocarobenzoxy derivative of cystine has been obtained by Swan [*Nature* 180, 643 (1957)] as well as a number of other mixed disulphides, and I should think the Australians are probably busy doing just this sort of thing.

## PEPTIDE DER HYDROXYAMINOSÄUREN; SPEZIELLE PROBLEME

M. BRENNER\* und A. HARTMANN •

Organisch-chemische Anstalt, Universität Basel

### Allgemeines

Die hydroxylhaltigen Aminosäuren Serin, Threonin, Hydroxyprolin, *allo*-Hydroxyprolin, Hydroxylysin, *allo*-Hydroxylysin und Tyrosin, auf die sich die vorliegende Diskussion beschränken soll, unterscheiden sich in Charakter und Reaktivität der Hydroxyl-Gruppe. Während die Verhältnisse beim phenolischen Tyrosin und beim cyclischen Hydroxyprolin<sup>53</sup> relativ übersichtlich sind,\*\* weisen die  $\beta$ -Hydroxysäuren Serin und Threonin eine Vielfalt von Reaktionsmöglichkeiten auf. Es ist hier nicht nur eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber acylierenden und alkylierenden Agentien, sondern auch die Tendenz zu Eliminierungs-Reaktionen<sup>10,11,65,81,96</sup> und zur Abspaltung von Formaldehyd bzw. Acetaldehyd (umgekehrte Aldol-Kondensation<sup>16,96</sup>) zu berücksichtigen; die Nachbarstellung der Aminogruppe sowie jene der Carboxylgruppe begünstigt bei geeigneter Substitution die Ausbildung ringförmiger Strukturen, die stabil sein können (z. B. Oxazoline, Cycloserin<sup>38,79</sup>) oder unter Entstehung von Umlagerungsprodukten zerfallen (Acylwanderungen<sup>39,84</sup>, Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion<sup>21</sup>). Die Chemie der stereomeren  $\delta$ -Hydroxylysine und ihrer Derivate ist noch wenig erforscht. Immerhin haben jüngste Untersuchungen<sup>107,108</sup> interessante Effekte der  $\delta$ -ständigen Hydroxyl-Gruppe aufgedeckt, die beim Lysin fehlen und damit ein teilweise verschiedenes reaktives Verhalten dieser beiden Aminosäuren bedingen. Das charakteristische Merkmal der  $\delta$ -Hydroxylysine, ihre Fähigkeit zur Laktonebildung, findet sich auch beim *allo*-Hydroxyprolin. Diese Aminosäure wird daher ebenfalls eine andere Reaktivität als das verwandte Hydroxyprolin aufweisen.

### Verhalten des ungeschützten Hydroxyls beim Aufbau von Peptiden

Bei der Synthese von Peptiden des Serins, Threonins, Hydroxyprolins und Tyrosins scheint der Erfolg dafür zu sprechen, daß bei Verwendung der heute üblichen Methoden zur Carboxyl-Aktivierung auf einen Schutz der Hydroxyl-Gruppe verzichtet werden darf, wenn sich diese in der Aminosäurekomponente befindet.

Steht jedoch das Hydroxyl in der Säurekomponente, so kann eine Maskierung notwendig werden. Dies gilt besonders dann, wenn zur Aktivierung ein Säurechlorid oder ein gemischtes Anhydrid nach Kenner hergestellt wird<sup>28</sup>. Bei Verwendung gemischter Anhydride nach Boissonnas-Wieland-Vaughan,

\* Vorgetragen von M. Brenner.

\*\* Über eine unerwartete Reaktion eines Tyrosin-Derivates berichten Schnabel und Zahn<sup>86</sup>: Beim Azidieren von Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycin-hydrazid mit überschüssigem Nitrit wird der Phenolkern des Tyrosins nitriert. Diese Reaktion kann bei Vermeidung eines Nitritüberschusses verhindert werden. — Für die beim Oxytocin beobachtete Aufspaltung einer Tyrosin-Peptidbindung ist von Witkop kürzlich eine interessante Deutung aufgefunden worden<sup>101</sup>.

von Phosphoroxchlorid<sup>98</sup>, von Derivaten der phosphorigen Säure, von Aziden und Carbodiimiden sowie aktivierten Estern ist die Gefahr von Nebenreaktionen geringer.

Wird schließlich die Peptidbindung über das Phosphorazo-Verfahren (Aktivierung der Aminkomponente) gebildet, so erscheint die Maskierung von Hydroxyl-Gruppen in der Amin- und Säurekomponente dringend geboten.

Gute Vorschriften zur Herstellung von Carbobenzoxy-serin (L, D, DL) und der entsprechenden Benzylester finden sich bei Baer und Maurukas<sup>3</sup>, eine solche zur Herstellung von Carbobenzoxy-L-threonin bei Merryfield<sup>69</sup>. N-Tosyl-threonin<sup>17</sup> wird beim Versuch zur Abspaltung der Tosylgruppe mit Natrium in flüssigem Ammoniak völlig zerstört, indem dabei wahrscheinlich intermediär N-Tosyl- $\alpha$ -amino-acrylsäure entsteht<sup>18</sup>.

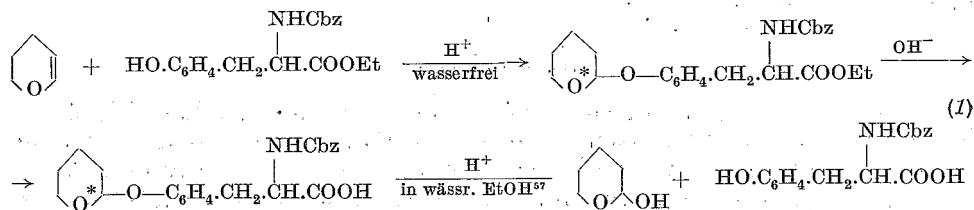
Überblickt man das in der Literatur niedergelegte Material, so muß man sich darüber wundern, wie oft es gelungen ist — oder scheinbar gelungen ist — bei der Synthese von hydroxylhaltigen Peptiden ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen auszukommen. Das phenolische Hydroxyl des Tyrosins und das primäre Hydroxyl von Serin sind immerhin relativ reaktionsfreudig; vom letzteren gilt dies besonders, wenn es in Nachbarschaft zu einer anhydridartig aktivierten Carboxylgruppe steht. Aber auch in den übrigen Fällen ist die Reaktivität der Hydroxyl-Gruppe keineswegs zu vernachlässigen. Aus dieser Erkenntnis heraus, und im Bestreben, unübersichtliche Umsetzungen konsequent zu vermeiden, wird der Technik der OH-Maskierung in jüngster Zeit vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet.

### Maskierung der Hydroxyl-Gruppe

Man kann die aromatische Hydroxyl-Gruppe nach Belieben acylieren oder veräthern (Benzyläther, Tetrahydropyranyläther). Bei Serin und Threonin eignet sich die Acylierung weniger, weil die Acylgruppe die Tendenz zur  $\beta$ -Eliminierung erhöht. In bezug auf Hydroxyprolin liegen unseres Wissens nur Daten über die Acetylierung vor. Die Verhältnisse beim Hydroxylysin lassen die Verätherung als vorteilhafter erscheinen. Die Literatur vermittelt folgendes Bild vom gegenwärtigen Stand des Problems.

#### Tyrosin

Bekannt sind O-Acetyl-L-tyrosin<sup>85</sup>, O-Acetyl-N-carbobenzoxy-L-tyrosin<sup>12</sup>, O-Benzoyl-L-tyrosin<sup>49</sup>, O-Carbobenzoxy-tyrosin<sup>76</sup>, O,N-Dicarbobenzoxy-L-tyrosin<sup>59</sup>, O-Tosyl-L-tyrosin und seine N-Carbobenzoxy-Verbindung<sup>82</sup>, sowie neuerdings das O-Benzyl-L-tyrosin und seine N-Carbobenzoxy-Verbindung<sup>102</sup>; der Benzyläther wird wie die O-Acylverbindungen am besten über das Kupfersalz von Tyrosin erhalten. Ferner wurde kürzlich das N-Carbobenzoxy-O-tetrahydropyranyl-L-tyrosin nach (I) dargestellt<sup>55</sup>.\*\* Die Tetrahydropyranyl-Verbindung enthält ein neues Asymmetrie-Zentrum. Man erhält deshalb in der Regel ein Diastereomeren-Gemisch.



\*\* Die alkalische Ester-Verseifung erfolgt bemerkenswerterweise viel leichter als beim Carbobenzoxy-tyrosinäthylester.

Die Abspaltung von Acetyl und Benzoyl, vermutlich auch die Abspaltung von Tosyl, erfolgt hydrolytisch, alkoholytisch oder ammonolytisch, jene des Benzylrestes hydrogenolytisch oder mittels Natrium in flüssigem Ammoniak; zur Entfernung des alkali- und hydrogenolysebeständigen Tetrahydropyranylesteres wird die Acetalgruppierung sauer aufgespalten<sup>54</sup>.

### Serin

O-Acetyl-serin (DL bzw. L) wird nach der alten Methode von Sakami und Toennies<sup>83</sup> oder durch säurekatalysierte Veresterung in Eisessig dargestellt<sup>90</sup>. O-Acetyl-N-carbobenzoxy-DL-serin kann leicht durch Acetylierung von N-Carbobenzoxy-DL-serin<sup>3</sup> erhalten werden<sup>43</sup>. Angaben über O-Carbobenzoxy-DL-serin sowie O,N-Dicarbobenzoxy-DL-serin finden sich bei Frankel und Hal-  
mann<sup>43</sup>. O-Benzoyl-serin kann aus N-Benzoyl-serin-methylester durch Wasserabspaltung (Thionylchlorid) zum Oxazolin, alkalische Verseifung der Estergruppe und anschließende Säurebehandlung erhalten werden<sup>9,35</sup>. O-Benzyl-DL-serin (zur Razematenspaltung vgl.<sup>46</sup>) und seine Carbobenzoxy-Verbindungen sind erst kürzlich bekannt geworden<sup>48,73</sup>. Die Herstellung des O-Benzyl-serins erfolgt nach Grassmann und Mitarbeitern<sup>48</sup> besser durch Synthese aus Acrylester als durch Ver-  
ätherung des Serin-Hydroxyls. Das Serin-Hydroxyl läßt sich aber wie jenes des Tyrosins mit Dihydropyran umsetzen. Die Darstellung von N-Carbobenzoxy-O-tetrahydropyranyl-DL-serin entspricht jener des Tyrosinderivates<sup>55</sup>.

Über die Abspaltung dieser Schutzgruppen ist schon im Abschnitt Tyrosin einiges gesagt worden. Freies Acetyl- und freies Benzoylserin neigen in alkalischen Medien zur Bildung der entsprechenden N-Acyl-serine, im Peptidverband zur Abspaltung von Essigsäure bzw. Benzoe-  
säure. Gegen saure Hydrolyse ist speziell die Acetylverbindung wahrscheinlich empfindlicher als Peptidbindungen.

### Threonin und Hydroxyprolin

Eine Vorschrift zur Herstellung der O-Acetyl-Verbindungen von DL-Threonin und Hydroxy-  
prolin findet sich bei Sakami und Toennies<sup>83</sup>. Inbezug auf Threonin sei hier erwähnt, daß es sich nach Sheehan und Mitarbeitern<sup>90</sup> im Gegensatz zu Serin direkt in die N-Phthalyl-Verbindung überführen läßt; beim Serin erwies sich vorgängige Acetylierung als notwendig oder mindestens vorteilhaft. O-Benzoyl-threonin ist wie das O-Benzoyl-serin durch saure Aufspaltung des zu-  
gehörigen Oxazolins zugänglich. Letzteres erhält man z. B. durch Kondensation von L-Threonin-  
äthylester mit Benziminoäthyläther und anschließende alkalische Hydrolyse der Estergruppierung<sup>34,36</sup>.

Patchett und Witkop<sup>77</sup> beschreiben den N-Acetyl-O-tosyl-L-hydroxyprolin-methylester. Durch Verseifung der Estergruppe entsteht die zugehörige Säure, und aus deren Anion unter Ausstossung von Toluolsulfonat und Inversion am  $\gamma$ -Kohlenstoff-Atom das N-Acetyl-L-*allo*-  
hydroxyprolin-lacton. Die Tosylgruppe ist also nur bedingt als Schutzgruppe für das Hydroxy-  
prolin-Hydroxyl zu betrachten. Sie ändert hier die Reaktivität des gesamten Moleküls. Diesem Umstand mag im Zusammenhang mit dem Problem eines spezifischen Abbaus von Hydroxy-  
prolin-peptiden noch besondere Bedeutung zukommen; man vergleiche hierzu<sup>101</sup>.

### *allo*-Hydroxyprolin und $\delta$ -Hydroxylysine

Es scheinen noch keine Daten über die Maskierung der Hydroxylgruppe vorzuliegen. Indessen ist hier Laktonbildung möglich. Die beiden stereoisomeren  $\delta$ -Hydroxylysine laktonisieren in Form ihrer N,N'-Dicarbobenzoxyverbindungen spontan<sup>108</sup>. Im Falle des N-Carbobenzoxy-L-*allo*-  
hydroxyprolins erfordert die Laktonisierung ein Kondensationsmittel (Tosylchlorid in Pyridin, Dicyclohexylcarbodiimid<sup>77</sup>).

### Acylwanderung

Peptide, welche Serin und Threonin enthalten, zeigen eine erhöhte Labilität in saurer Lösung. So wird nach Desnuelle und Casal<sup>33</sup> und besonders Elliott<sup>37</sup> die Peptidbindung, an der die Hydroxy-aminosäure mit ihrer Aminfunktion beteiligt ist, gelöst, und der Acylrest wandert, wahrscheinlich über eine cyclische Zwischenstufe<sup>6,37</sup>, an das Hydroxyl. Die so entstandenen Esterbin-  
dung ist hydrolyseempfindlicher als eine Peptidbindung; die Acylwanderung kann deshalb relativ leicht zum völligen Entzweibrechen einer Kette führen.

Es wird z. B. nach Harris und Mitarbeitern<sup>50</sup> das N-Glycyl-serin bei der sauren Hydrolyse 5mal schneller gespalten als das isomere Seryl-glycin.

Eine Wanderung des Acylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff ist in Gegenwart folgender Agenzien beobachtet worden: kalte konzentrierte Schwefelsäure<sup>30,33,37,71</sup>, alkoholische Salzsäure<sup>6,32,109</sup>, wasserfreie Phosphorsäure<sup>105</sup>, Salzsäure in Nitromethan<sup>30</sup>, Acetanhydrid in Methanol<sup>52</sup>, wasserfreie Ameisensäure<sup>58</sup>, Ameisensäure-Bortrifluorid<sup>6</sup>. Konzentrierte Schwefelsäure und wasserfreie Ameisensäure scheinen von ganz spezifischem Einfluß zu sein. Edestin wird nach längerem Stehen in konz. Schwefelsäure durch 6N Salzsäure (18°) 70mal rascher hydrolysiert als ohne vorangehende Schwefelsäurebehandlung<sup>32</sup>. Lysozym<sup>58</sup> und Ribonuklease<sup>59</sup> verlieren beim Stehen in Ameisensäure ihre enzymatische Aktivität. Die Inaktivierung ist reversibel (vgl. unten). Man vermutet Acylwanderung und spricht von „N,O-Peptidylshift“<sup>37,59</sup>. Analog entsteht aus N-Glycyl-serin bei längerem Stehen in konz. Schwefelsäure in mäßiger Ausbeute O-Glycyl-serin<sup>70</sup>.

In Wasser findet oberhalb pH 7 der umgekehrte Prozeß statt, also Acylwanderung vom Sauerstoff zum Stickstoff. Aus O-Glycyl-serin erhält man N-Glycyl-serin und Ameisensäure-inaktiviertes Lysozym wird wieder aktiv<sup>58</sup>. Ebenso verhält sich die inaktivierte Ribonuklease<sup>59</sup>.

Die Hydroxyle von Serin und Threonin lassen sich auch mit anorganischen Säuren verestern. Bekannt sind O-Sulfate<sup>80</sup> und O-Phosphate<sup>42,72,81</sup>. Nach Riley und Turnbull<sup>81</sup> lagert O-Phosphoryl-serin nicht in das N-Isomere um. Hingegen haben Plapinger und Wagner-Jauregg<sup>78</sup> bei mehrstündigem Kochen von N-(Diisopropyl-phosphoryl)-serin-methylester mit 5%iger Salzsäure in einer Ausbeute von 25% O-Phosphoryl-serin erhalten.

### O-Peptide

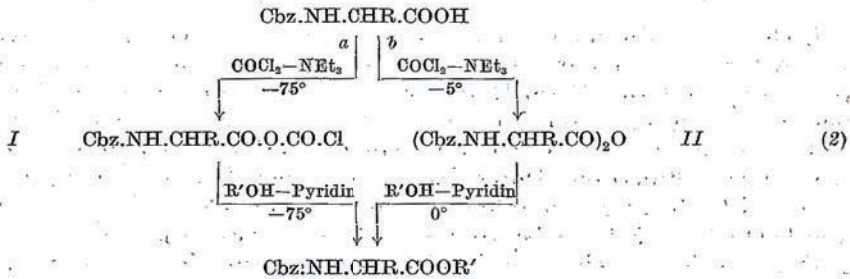
O-Glycyl-L-serin ist das einfachste O-Peptid. Es kann durch Acyl-Wanderung aus N-Glycyl-serin dargestellt werden<sup>70</sup>. Der Glycin-Rest wird dabei vom Serin-Stickstoff zum Serin-Hydroxyl verschoben. In gleicher Weise läßt sich ein am Serin-Stickstoff haftender Peptidrest verschieben (N,O-Peptidylshift<sup>37,59</sup>). Meistens aber bereitet man O-Peptide durch direkte Acylierung der Hydroxylfunktion. Durch Erwärmen einer Lösung von Carbobenzoxy-serin, N-Carboxy-glycin-anhydrid und 1 Äquivalent Salzsäure in Dioxan wurde O-Glycyl-N-Carbobenzoxy-serin-hydrochlorid erhalten<sup>70</sup>. Wegen Nebenreaktionen eignet sich dieses Verfahren wenig zur Herstellung von größeren Mengen. Vorteilhafter ist die Einführung des Glycins über eine Vorstufe oder in geschützter Form.

N-Carbobenzoxy-serin wird beispielsweise mit Chloracetylchlorid oder Bromacetylbromid behandelt, das Halogen durch die Azidogruppe ersetzt und diese der Hydrierung unterworfen, unter gleichzeitiger Hydrogenolyse der Carbobenzoxy-Gruppe<sup>71</sup>. Man kann auch mit Azidoacetylchlorid acylieren. Velluz und Mitarbeiter<sup>84</sup> acylieren N,N-Dibenzyl-DL-serin mit N,N-Dibenzylglycin über das Chlorid oder das gemischte Anhydrid nach Boissonnas und unterwerfen das Reaktionsprodukt als Hydrochlorid der Hydrogenolyse in Gegenwart von Palladium. Anstelle der Dibenzyl-Verbindungen sind auch die Trityl-Verbindungen verwendet worden (Anhydrid-Methode); die Abspaltung der Tritylreste erfolgte durch Stehenlassen in salzsaurem wäßrigem Aceton. Verwendung von N,N-Dibenzyl-glycin und Trityl-DL-serin und Behandlung des Esters (Anhydrid-Methode) mit salzsaurem wäßrigem Aceton gab O-(N,N-Dibenzyl-glycyl)-DL-serin. Durch Vertauschung der Schutzgruppen bei der eben besprochenen Synthese ist O-Glycyl-N,N-dibenzyl-DL-serin erhalten worden. In entsprechender Weise haben die französischen Autoren O-Glycyl-DL-threonin-hydrochlorid und O-(D- $\alpha$ -Aminobutryl)-L-threonin-hydrochlorid hergestellt (Verwendung von N,N-Dibenzyl-DL-threonin bzw. N,N-Dibenzyl-L-threonin).

O-(Carbobenzoxy-glycyl)-N-carbobenzoxy-serin (DL, D, L) ist aus dem gemischten Anhydrid von Carbobenzoxy-glycin mit Isovaleriansäure und dem Triäthylammoniumsalz von Carbobenzoxy-serin in Methylenchlorid erhalten worden<sup>71</sup>. Bei Verwendung der Anhydride mit Isovaleriansäure<sup>93</sup> muß man jedoch immer mit einer parallel laufenden Bildung von Isovalerianester rechnen.

Die einfacher zu handhabenden gemischten Anhydride mit Alkylkohlenensäuren sind mit Erfolg zur Herstellung von Estern des Benzylpenicillins herangezogen worden<sup>8,56</sup>; auch Velluz und Mitarbeiter<sup>94</sup> haben, wie oben erwähnt worden ist, auf diese Weise verestert. Das Verfahren ist aber mit einem prinzipiellen Nachteil behaftet. Aus jeder Molekel des gemischten Anhydrides  $\text{RCO}-\text{O}-\text{COOR}'$  wird bei der Veresterung mit dem Reaktionspartner  $\text{R}'\text{OH}$  eine Molekel Alkohol  $\text{R}'\text{OH}$  frei.  $\text{R}'\text{OH}$  tritt mit  $\text{R}'\text{OH}$  in Konkurrenz. Wo letzteres nicht sehr viel schneller reagiert oder nicht im Überschuß eingesetzt werden kann, erhält man ein unreines Reaktionsprodukt oder eine schlechte Ausbeute. Bei der Acylierung von Salicylsäure-benzylester mit Carbobenzoxy-DL-phenylalanin mittels Chlorameisensäure-äthylester haben wir nur 25% der theoretisch zu erwartenden Estermenge erhalten. Ferner liefert Phthalyl-glycin mit  $\text{ClCOOR}'$  und  $\text{R}'\text{OH}$  nur dann einen reinen Ester Phth-Gly-OR', wenn  $\text{R}'$  und  $\text{R}$  identisch sind ( $\text{R}' = \text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$  oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ ). Wird das gemischte Anhydrid aus Phthalyl-glycin und Chlorameisensäure-äthylester mit Methyl- oder Benzylalkohol umgesetzt, so resultieren Estergemische<sup>20</sup>.

Die Entstehung unerwünschter Ester ist ausgeschlossen, wenn man zur Aktivierung der Carboxylgruppe Phosgen anstelle von Chlorameisensäureestern oder Carbonsäurechlorid verwendet<sup>20</sup>. Unter geeigneten Bedingungen reagieren die gemischten Anhydride *I* in guter Ausbeute nach (2a) mit der zu veresternden Hydroxylverbindung, ohne daß es zur Ausbildung symmetrischer Anhydride<sup>97</sup> *II* kommt (2b). Dieses „Phosgenverfahren“ eignet sich nach unseren Befunden sehr gut zur Carbobenzoxy-aminoacylierung von aromatischen oder aliphatischen Hydroxyl-Verbindungen. Eine Razemisierung optisch aktiver Komponenten ist bisher nicht beobachtet worden.

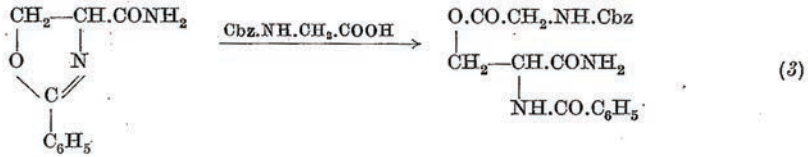


Hartmann<sup>51</sup> und Beglinger haben auf diese Weise ohne Mühe folgende acht Derivate von Serin und Threonin in kristalliner Form dargestellt: O-(Carbobenzoxy-glycyl)-N-benzoyl-DL<sup>20</sup> und L-serinamid, O-(Carbobenzoxy-glycyl)-N-carbobenzoxy-DL-serin<sup>20</sup> und dessen Amid, O-(Carbobenzoxy-glycyl)-N-benzoylglycyl-DL-serinamid, O-(Carbobenzoxy-L-phenylalanyl)-L-seryl-glycinamid, O-(Carbobenzoxy-glycyl)-N-benzoyl-DL-threoninamid und O-(Trityl-glycyl)-N-carbobenzoxy-DL-threoninamid.

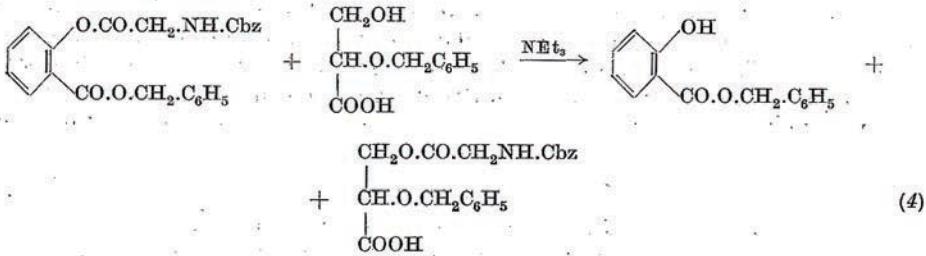
Das O-Carbobenzoxy-glycyl-N-benzoyl-serinamid ist in unserem Laboratorium auch aus N-Benzoyl-serinamid und dem symmetrischen Carbobenzoxy-glycin-anhydrid<sup>97</sup> sowie durch Zusammenschmelzen von Carbobenzoxy-glycin mit 2-Phenyl-4-carbamido-oxazolin nach (3) bereitet worden (J. Wehrmüller, nicht publiziert; vgl. dazu<sup>45</sup>).

Hydrogenolyse der Carbobenzoxy-Gruppe in Gegenwart von 1 Äquivalent Salzsäure und 60–70%igem Äthanol als Lösungsmittel lieferte überall die

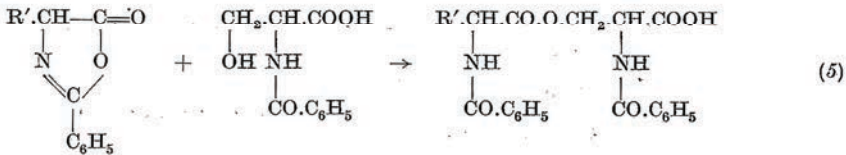
erwarteten Hydrochloride, die in den meisten Fällen kristallisierten. O-Peptide, welche am Serin-Stickstoff acyliert sind, zerfallen in wäßriger Lösung unterhalb pH 7 relativ langsam. Sie sind in Form ihrer Salze mit Halogenwasserstoffsäuren stabil genug, um ihre Reindarstellung zu gestatten.



Erwähnt sei in diesem Zusammenhang noch eine andere Möglichkeit. Brenner und Mitarbeiter<sup>26</sup> benützten vor kurzem eine Umesterungs-Reaktion, um den Carbobenzoxy-glycyl-Rest in eine aliphatische Hydroxylgruppe einzuführen:  $\alpha$ -Benzyloxy- $\beta$ -hydroxypropionsäure gab mit O-(Carbobenzoxy-glycyl)-salicylsäure-benzylester<sup>20</sup> in Gegenwart von überschüssigem Triäthylamin bei 80° glatt  $\alpha$ -Benzyloxy- $\beta$ -(carbobenzoxy-glycyl-oxy)-propionsäure (4).



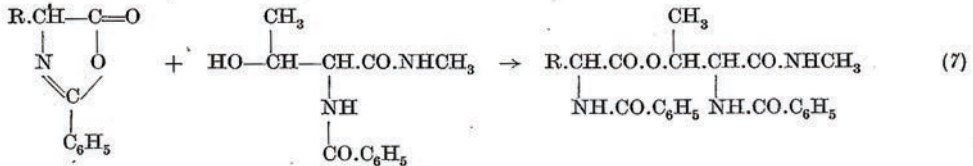
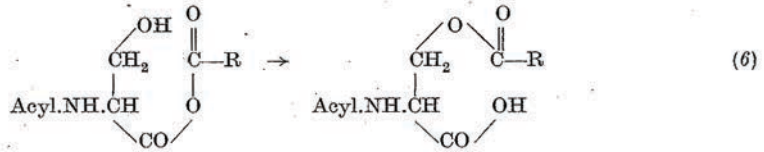
Während die erwähnten Methoden die Bereitung auch optisch aktiver O-Peptide gestatten, dürfte dies bei dem durch Schema (5) wiedergegebenen Verfahren von Botvinik<sup>15</sup>, wegen der leichten Razemisierbarkeit der Oxazolone, weniger zutreffen.



Vermutlich reagiert bei Acylierungsreaktionen an N-Acyl-serinen mit freiem Carboxyl nicht immer primär das Hydroxyl, sondern manchmal zunächst das Carboxyl unter Ausbildung eines gemischten Anhydrides. Das Hydroxyl wird dann sekundär nach (6) in einer intramolekularen Reaktion acyliert. Dies muß jedoch nicht unbedingt der Fall sein, wie die von Botvinik<sup>2</sup> angegebene Umsetzung (7) dartut.

Ihres biologischen Interesses wegen seien an dieser Stelle noch O-Carbamyl-L-serin und O-Carbazyll-DL-serin genannt. Sie entstehen aus dem Reaktionsprodukt von N-Carbobenzoxy-serin-benzylester (L bzw. DL) und Phosgen

mit Ammoniak bzw. Carbobenzoxy-hydrazin und anschließende Debenzylierung<sup>66,91</sup>.



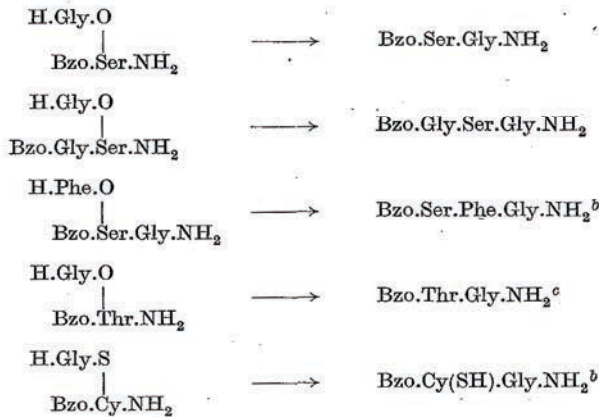
### Die Aminoacyleinlagerungs-Reaktion

Behandelt man die in Tabelle I zusammengestellten O-Peptide mit einer starken Base, wie *tert*-Butylat-Ion in *tert*-Butanol oder Amid-Ion in flüssigem Ammoniak, so entstehen durch Umlagerung die auf der rechten Seite der Tabelle angeführten Produkte. Prinzipiell kann das Serin- oder Threonin-Hydroxyl in den bei der Umlagerung gebildeten Di- und Tripeptid-Derivaten von neuem mit einer Aminosäure verestert werden; abermalige Umlagerung

Tabelle I

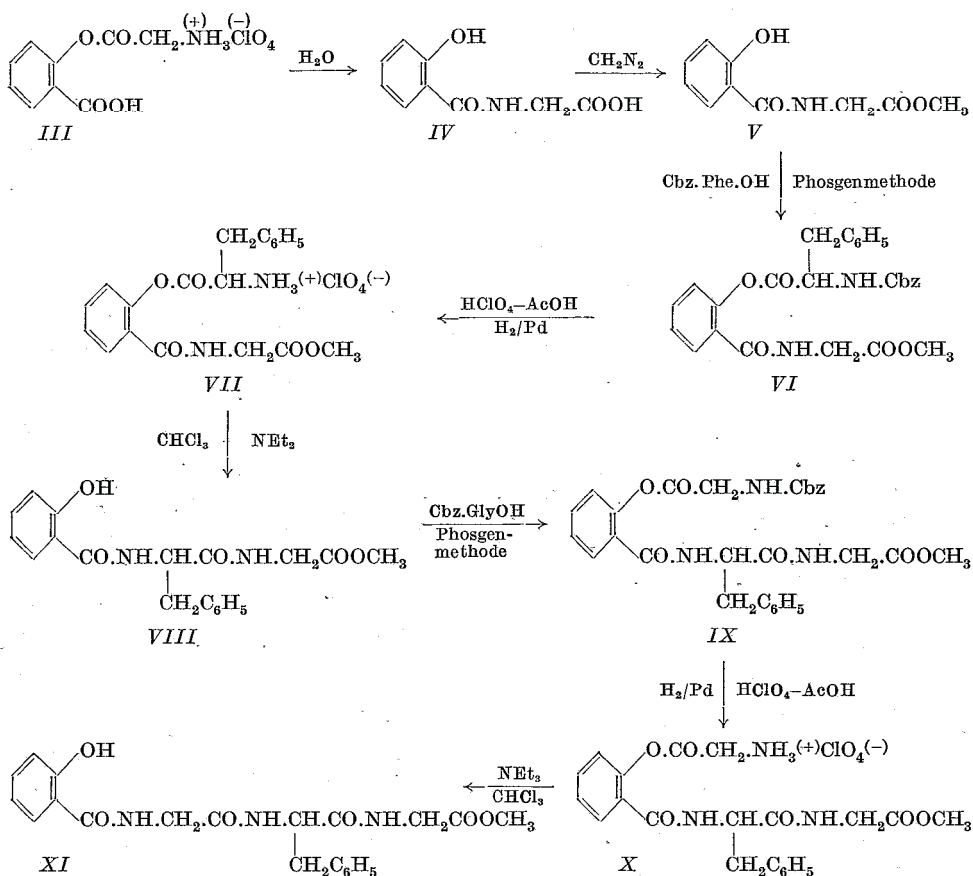
Aminoacyl-Einlagerung bei Derivaten von Serin und Threonin

Kalium-*tert*-butylat-*tert*-Butanol. Die Asymmetriezentren von Serin und Threonin bleiben erhalten.



<sup>a</sup> Bzo Benzoyl. <sup>b</sup> Nur papierchromatographisch identifiziert; die anderen Produkte sind in guter Ausbeute kristallisiert gefaßt worden. <sup>c</sup> Gilt auch für das entsprechende Derivat des *allo*-Threonins.

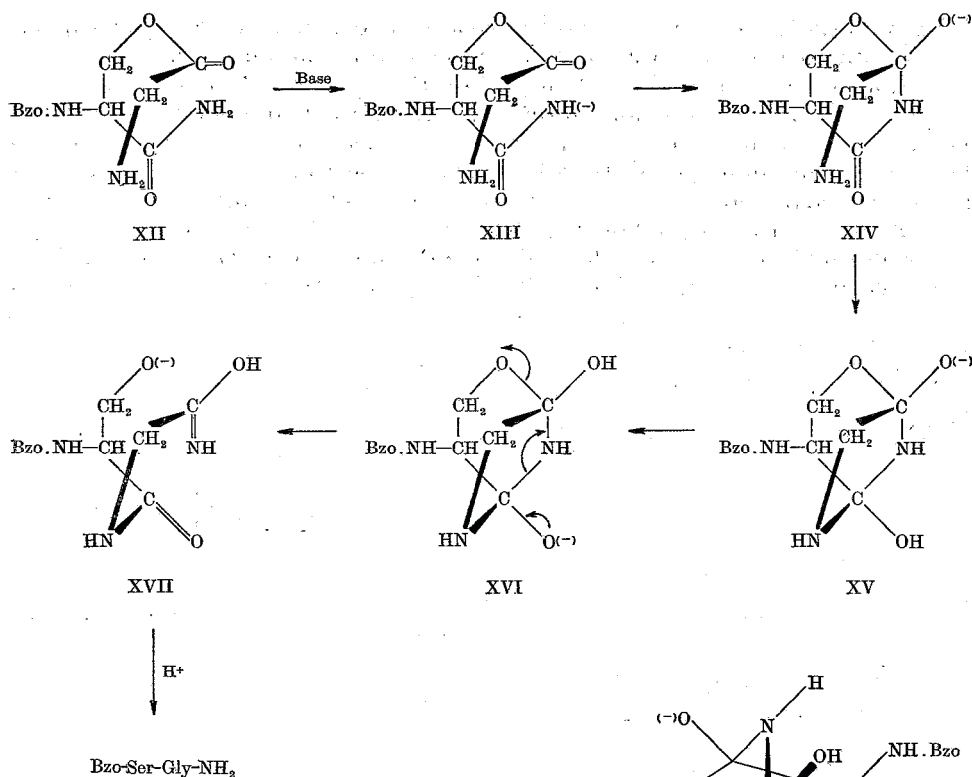
fürhte darn zu Tri- bzw. Tetrapeptid-Derivaten, in denen die Hydroxyl-Gruppen erneut aminoacylierbar wären, usw. Eine Serie von aufeinanderfolgenden Reaktionen dieser Art ist in der Salicylsäure-Reihe durchgeführt worden<sup>19-23,25</sup>. Die Umlagerung verläuft dort unter etwas mildereren Bedingungen als in der aliphatischen Reihe, weil der starre Benzolring der Salicylsäure die reagierenden Zentren in räumlich günstiger Lage fixiert. Sonst besteht kein Unterschied zwischen den Reaktionen in der aromatischen und der aliphatischen Reihe. Das Asymmetriezentrum von Phenylalanin bleibt bei allen in Schema (8) angeführten Operationen erhalten. Wie man sieht (Formeln III und IV) kann die Umlagerungsreaktion auch unter Beteiligung eines freien Carboxyls erfolgen.



Schema (8)

In der aliphatischen Reihe ist ein entsprechender Schritt bisher nicht verwirklicht worden; er ist aber grundsätzlich möglich und seine Ausführung hängt nur von der Reaktionslenkung durch einen geeigneten Katalysator ab.

Aus den angegebenen Formeln [Tab. I und Schema (8)] ist weiter ersichtlich, daß bei der vorliegenden Umlagerungsreaktion der Aminoacylrest vom alkoholischen bzw. phenolischen Sauerstoff der Hydroxysäure abgelöst und



in die carboxylständige Peptidbindung der Hydroxysäure eingelagert wird. Aus diesem Grunde haben wir zur Bezeichnung der Reaktion den Ausdruck „Aminoacyl-Einlagerung“ vorgeschlagen<sup>21</sup>.

Die Aminofunktion von Serin bzw. Threonin ist an der Aminoacyl-Einlagerung nicht beteiligt. Sie muß aber geschützt werden, um eine Wanderung des einzulagernden Aminoacylrestes vom Sauerstoff zum Stickstoff zu vermeiden (O,N-Acylwanderung, vgl. oben).

Bei allen Einlagerungsreaktionen an O-(Aminoacyl)-hydroxysäure-amiden sind basische Bedingungen erforderlich (Basen-Katalyse). Sie bewirken eine Ionisierung der Hydroxycarbonsäureamid-Gruppierung und leiten damit die Aminoacyl-Einlagerung ein. Aus Gründen, die wir an anderer Stelle diskutiert haben<sup>21-23,27</sup>, formulieren wir die Umlagerung von O-Glycyl-N-benzoylserin-amid versuchsweise nach (9). Das Zwischenprodukt XVI ist ein Abkömmling des Bicyclo[3,2,1]octans und wird, der in der Tropan-Reihe üblichen Schreibweise entsprechend, vorteilhaft nach XVIa formuliert.

Die Aminoacyleinlagerungs-Reaktion eröffnet offensichtlich neue Perspektiven auf dem Gebiet der Peptidsynthese. Wir werden unten darauf zurückkommen. Vorerst sind noch einige weitere Ergebnisse zu diskutieren. Ausgehend von der Struktur des O-(Glycyl)- $\beta$ -hydroxybuttersäure-amids (Tab. II, erste Formel), das wie das Threoninderivat in Tabelle I umlagert, gelangt

Tabelle II

Aminoacyl-Einlagerung bei O-Glycyl- $\beta$ -hydroxybuttersäure-amid, O- $\beta$ -Alanyl-glycolsäure-amid  
 O-Glycyl-glycolsäure-amid und O- $\beta$ -Alanyl- $\beta$ -hydroxybuttersäure-amid  
 Alle Umlagerungsprodukte sind in kristallisierter Form gefaßt und durch Analyse, Schmelzpunkt  
 und Mischprobe identifiziert worden.

O-(Aminoacyl)-hydroxy- säure-amid	Ringsystem <sup>a</sup> im hypothetischen Zwischenprodukt	Umlagerungsprodukt
	Bicyclo[3,2,1]- octan	
	Bicyclo[2,3,1]- octan	
	Bicyclo[2,2,1]- heptan	
	Bicyclo[3,3,1]- nonan	

<sup>a</sup> Nomenklatur nach Chem. Abstr. 39, 5884 (1945).

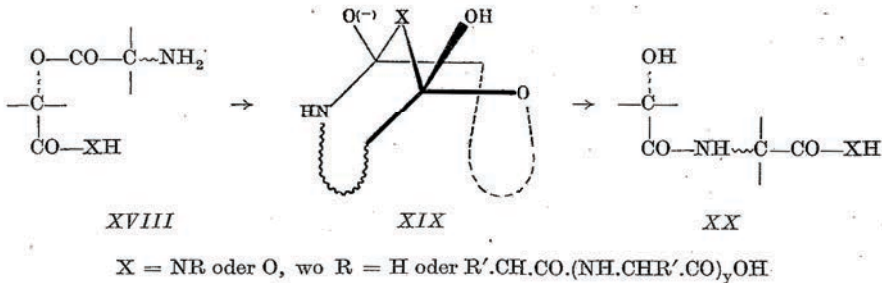
man durch Variation der Kettenlänge formal zu den übrigen Verbindungen in Kolonne 1 von Tabelle II. Wir haben diese Substanzen hergestellt. Durch Aminoacyl-Einlagerung entstehen die Produkte in Kolonne 3 von Tabelle II (siehe<sup>24</sup>).

Aus obigen Ergebnissen folgt, daß der Spielraum der Aminoacyleinlagerungs-Reaktion in bezug auf die strukturellen Voraussetzungen größer ist, als ursprünglich<sup>21</sup> angenommen wurde. Die Grenzen sind vorläufig unbekannt. Wenn es Katalysatoren gibt, welche durch Zusammenführen der reaktiven Zentren (vgl. dazu Formeln XII bis XVI) die Ausbildung bicyclischer Systeme der Formel XIX mit beliebig großer Zahl der Ringglieder\* gewährleisten, so sollte jedes sterisch ungehinderte O-(Aminoacyl)-hydroxysäure-amid und jede sterisch ungehinderte O-(Aminoacyl)-hydroxysäure der Umlagerung unterworfen werden können (beliebig große Kettenlänge der Aminoacyl- und der Hydroxysäure-Komponente, Formeln XVIII und XX). Es ist also grundsätzlich denkbar, daß ein Serin-Hydroxyl in einem serinhaltigen Polypeptid beliebiger Konstitution eine Aminosäure oder ein Peptid zunächst esterartig bindet und anschließend diesen Acylrest in eine beliebige Peptidbindung auf der Carboxylseite des Serinrestes einlagert.

Eine weitere Variante der Aminoacyl-Einlagerung ist aus folgender Überlegung heraus aufgefunden worden: O-(Glycyl)-glycolsäure-amid ist ein strukturelles Analogon von Glycyl-glycin-amid. Unter der Voraussetzung, daß

\* Das Minimum ist 7, entsprechend der Zahl der Ringglieder im Bicyclo[2,2,1]heptan.

der Mechanismus der Aminoacyl-Einlagerung auch bei Ersatz von Estersauerstoff durch Iminostickstoff spiele, war in einem stark basischen Medium die Umwandlung von Glycyl-glycin-amid in ein Glycyl-glycin-amid mit vertauschten Glycin-Resten zu erwarten. Der Versuch ist unter Verwendung von Phenylalanyl-glycinamid und Glycyl-phenylalanin-amid ausgeführt worden. Die beiden Dipeptidamide werden tatsächlich ineinander umgewandelt. Die Gleichgewichtslage ist wegen der relativen Unbeständigkeit (Diketo-piperazinbildung usw.) der beiden Substanzen nicht leicht bestimmbar. Es scheint aber, daß das Gleichgewicht in Kalium-*tert*-butylat-*tert*-Butanol etwas, in Natriumamid-flüssigem Ammoniak stark auf der Seite von Phenylalanyl-glycin-amid liegt<sup>95</sup>.



Theoretisch gibt es nun keinen Grund, der diese Isomerisierungsreaktion auf Dipeptidamide beschränken würde. Um dies zu erkennen, braucht man nur in Formel XIX den Estersauerstoff durch Iminostickstoff zu ersetzen. Der an den Dipeptidamiden erhobene Befund läßt sich so auf beliebige Peptide extrapolieren. Wir gelangen damit zur Konzeption einer Sequenz-Tautomerie in Peptidketten, die überraschende Ausblicke eröffnet. Die Isomerisierung eines Peptids A.B.C. ... X.Y.Z in ein beliebiges isomeres Peptid (A,B,C ... ... X,Y,Z) durch eine Reihe aufeinanderfolgender Aminoacyleinlagerungsschritte scheint z. B. nur eine Frage von katalytisch regulierbaren Reaktionsgeschwindigkeiten zu sein.

Die praktische Gültigkeit unserer Extrapolationen bleibt zu bestimmen. Das tatsächlich vorliegende Versuchsmaterial besitzt aber schon so viel Gewicht, daß es gegeben erscheint, einige Ergänzungen zum klassischen Bild der Peptidchemie ins Auge zu fassen.

1. Seit der Formulierung der Peptidhypothese durch Hofmeister und E. Fischer wird als Bildungsweise von Peptidketten — sofern man von der Auffassung ausgeht, daß diese aus vorgebildeten Aminosäuren entstehen — ausschließlich ein sukzessives Aneinanderreihen von Aminoacylresten (Aminosäure-Reste, Peptidyl-Reste) in Betracht gezogen. Man hat also immer nur an „Aminoacyl-Anlagerung“ gedacht. Enthält nun aber ein vorgegebenes Peptid Serin bzw. Threonin (auch Cystein ist eine Möglichkeit), so stellt die zugehörige Hydroxylgruppe (Mercapto-Gruppe) eine Pforte dar, durch welche Aminosäuren direkt in das Innere dieses Peptids eintreten können. Die Enden der Peptidkette werden durch die Einlagerung nicht verändert, im Gegensatz zur Peptidverlängerung nach dem Anlagerungsverfahren. Dieser Umstand gestattet z. B. (im Gedankenexperiment) die Erweiterung eines Peptid-Ringes, wenn der Ring eine als Aminosäure-Akzeptor fungierende Hydroxyl-Gruppe enthält. Inbezug auf die Peptidsynthese ist also der Aminoacyl-Anlagerung als Alternative die Aminoacyl-Einlagerung an die Seite zu stellen.

2. Wir wissen noch nicht, ob sich die Aminoacyleinlagerungs-Reaktion umkehren läßt. Die Umkehrung würde einen neuen Weg zum Peptidabbau eröffnen und ließe in Kombination mit der Vorwärtsreaktion einen Austausch von Aminosäuren im Inneren einer Peptidkette gegen Aminosäuren im umgebenden Medium zu, ohne daß deshalb die Kette geöffnet werden müßte.

3. Die klassische Peptidchemie betrachtet ein Peptid als ein Gebilde mit feststehender Aminosäuresequenz. Sie hat die Vorstellung von der unveränderlichen Struktur der Moleküle aus der klassischen organischen Chemie übernommen. Zwar kennt man auch dort Umlagerungen und Tautomerie-Erscheinungen. Sie lassen sich aber in keiner Weise mit den Isomerisierungsmöglichkeiten vergleichen, welche bei Peptiden auf der Basis der Aminoacyleinlagerungs-Reaktion denkbar sind.

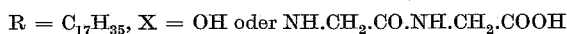
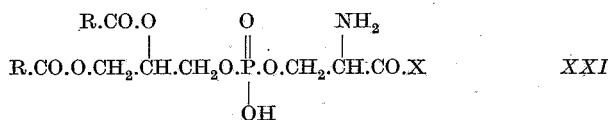
Die Untersuchungen über die Aminoacyl-Einlagerung führen uns damit zu folgender allgemeiner Aussage: Die Chemie der Polyamide bietet nicht nur in bezug auf die physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse, sondern auch hinsichtlich ihrer Synthese und ihrer Isomerisierungsfähigkeit, vielleicht auch hinsichtlich ihres Abbaus, prinzipielle Möglichkeiten, die jeder anderen Stoffklasse fehlen. Dies beruht auf der Reaktivität der Peptidbindung einerseits und der Existenz der  $\beta$ -Hydroxyaminosäuren andererseits.

### O-Phosphoryl-serin und Derivate

Unter dem Eindruck der vermutlichen biologischen Bedeutung des Phosphoryl-serins sind die Methoden zur Herstellung solcher Verbindungen verbessert und teilweise weiter entwickelt worden. Die Antipoden und das Raze-mat von O-Phosphoryl-serin werden von Fölsch und Mellander<sup>42</sup> sowie von Riley und Turnbull<sup>81</sup> beschrieben. Am besten wird N-Carbobenzoxy-serinbenzylester mit Diphenyl-phosphorsäure-chlorid in Pyridin acyliert und das Produkt der Hydrogenolyse unterworfen, wobei in Gegenwart von Palladium zunächst O-Diphenyl-phosphoryl-serin und anschließend in Gegenwart von Platin das O-Phosphoryl-serin entsteht; letztere Reaktion kann auf der Stufe des O-Monophenylphosphorylserins unterbrochen werden. In fast gleicher Weise lassen sich N-Carbobenzoxy-DL-seryl-glycin-benzylester, Carbobenzoxy-glycyl-DL-serin-benzylester und Carbobenzoxy-glycyl-DL-seryl-glycin-benzylester phosphorylieren<sup>41</sup>. Interessant ist die Beobachtung von Riley und Mitarbeitern<sup>81</sup>, daß N-Carbobenzoxy-O-(diphenylphosphoryl)-serin-äthylester unter dem Einfluß von Alkali in Carbobenzoxy-aminoacrylsäure übergeht. Dagegen läßt sich der (O-Diphenylphosphoryl)-serin-methylester durch Behandlung mit Alkali in Phosphoryl-serin überführen. Auf entsprechende Art erhalten Riley und Mitarbeiter<sup>81</sup> O-Phosphoryl-DL-threonin, O-Phosphoryl-DL-seryl-glycin und die O-Phosphoryl-L-seryl-L-glutaminsäure. Die leichte hydrolytische Abspaltbarkeit der Phenylreste aus den von Riley bearbeiteten Diphenylphosphoryl-Verbindungen läßt einen Einfluß der Amin- oder Carboxylfunktion der Hydroxyaminosäure vermuten (cyclische Zwischenprodukte?). Die Umsetzung von N-Carbobenzoxy-O-(diphenylphosphoryl)-serin-äthylester mit Hydrazin führte nicht zum gewünschten Hydrazid, sondern zur Eliminierung von Diphenylphosphorsäure. Interessante Angaben über das Säure-, Base- und Metallbindungsvermögen sowie über die Stabilität der Phosphorsäure-Esterbindung von O-Phosphoryl-serin und O-Phosphoryl-threonin finden sich bei Oesterberg<sup>72</sup> sowie Bamann und Mitarbeitern<sup>7</sup>.

Aus Distearoyl-L- $\alpha$ -glyceryl-phenylphosphoryl-chlorid und Carbobenzoxy-L-serinbenzylester bzw. Carbobenzoxy-L-seryl-glycyl-glycin-benzylester haben Baer und Maurukas<sup>8</sup> Kondensationsprodukte erhalten, welche bei der Hydrogenolyse der Schutzgruppen ein Phosphatidyl-serin bzw. Phosphatidyl-peptid (XXI) gaben. Eigenartig ist die Einwirkung von Diazomethan auf diese Phosphatidyl-Verbindungen: Durch Diazometholyse<sup>8</sup> bildet sich unter Spaltung der Phosphoryl-serin-Bindung der Dimethylester von Distearoyl-L- $\alpha$ -glycerin-

phosphorsäure. Leider geben die Autoren keine Angaben über das Schicksal der Serin- bzw. Seryl-glycyl-glycin-Komponente. Die Reaktion scheint auf solche Phosphatide beschränkt zu sein, welche eine freie Aminogruppe enthalten (Phosphatidyl-serine und Kephaline; Lecithine reagieren nicht).



### Zur Chemie von DL- $\delta$ -Hydroxylysin und DL- $\delta$ -alloHydroxylysin

Auf Grund einer kürzlich publizierten Untersuchung von Zahn und Zürn<sup>108</sup> erscheinen DL-Hydroxylysin und DL-*allo*Hydroxylysin erstmals in präparativem Maßstab zugänglich. Die Trennung der Stereoisomeren erfolgt durch fraktionierte Kristallisation der N,N'-Dicarbobenzoxy-lactone aus Essigester. Die Lactone bilden sich spontan; Hydrogenolyse in Methanol-Wasser und Aufspaltung des Lactonringes führt zu den Aminosäuren, die als Monohydrochloride isolierbar sind. Der Lactonring des Hydroxylysins öffnet sich langsamer als derjenige des *allo*Hydroxylysins; Hydroxylysin-lacton geht vor der Hydrolyse durch Acylwanderung in Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactam über. Witkop<sup>100</sup> schreibt dem Hydroxylysin auf Grund der Hudsonsehen Lactonregel die *erythro*-Konfiguration zu. Der beobachtete Unterschied in der Stabilität der Lactone steht mit dieser Zuordnung in Einklang<sup>108</sup>. Die beiden Dicarbobenzoxy-lactone liefern mit Ammoniak oder Hydrazin die entsprechenden Dicarbobenzoxyamide oder -hydrazide. Die aus den Hydraziden erhaltenen Azide wandeln sich so schnell in die Lactone zurück, daß sie sich kaum zur Verwendung bei Peptidsynthesen eignen. Hingegen gelang es in Anlehnung an Patchett und Witkop<sup>77</sup> durch Erhitzen von Dicarbobenzoxy-DL-*allo*hydroxylysin-lacton mit DL-Alaninamid bzw. Glycinamid in Dioxan die erwarteten Dipeptid-amid-Derivate zu bereiten. Die zugehörigen Dipeptidamide unterscheiden sich von Glycyl-alaninamid durch ihr Verhalten gegen heiße 1N Salzsäure; während Glycyl-alaninamid vorwiegend Ammoniak abspaltet, erfolgt bei den oben genannten *allo*Hydroxylysyl-aminosäure-amiden Spaltung in *allo*Hydroxylysin und Aminosäure-amid. Zahn und Zürn<sup>108</sup> folgern daraus eine allgemeine Säurelabilität von Hydroxylysyl-peptiden und übertragen diese Folgerung auch auf Peptide des *allo*Hydroxyprolins, weil auch dort ein Angriff des Hydroxyls auf die Carboxylgruppe sterisch möglich ist.

### Zur Chemie von Hydroxyprolin und *allo*Hydroxyprolin

N-Carbobenzoxy-L-*allo*hydroxyprolin wird aus N-Carbobenzoxy-L-hydroxyprolin erhalten, wenn letzteres mit Chromsäure zum N-Carbobenzoxy-4-keto-L-prolin oxidiert und dieses Keton durch Natriumborhydrid reduziert wird<sup>77</sup>. Unter der Einwirkung von Tosylchlorid auf N-Carbobenzoxy-L-*allo*hydroxyprolin in wasserfreiem Pyridin entsteht ohne Inversion, vermutlich über ein gemischtes Anhydrid, das N-Carbobenzoxy-L-*allo*hydroxyprolin-lacton. Zum selben Lacton gelangt man bei Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid. Andererseits führt die Tosylierung von N-Acetyl-L-hydroxyprolin-methylester

zu einem O-Tosyl-Derivat, das durch Verseifung der Estergruppierung in N-Acetyl-O-tosyl-L-hydroxyprolin übergeht; letzteres lactonisiert als Anion unter Inversion am  $\gamma$ -Kohlenstoffatom zum N-Acetyl-L-*allo*hydroxyprolin-lacton. N-Carbobenzoxy-L-*allo*hydroxyprolin-lacton reagiert mit Glycin-äthylester unter Aminolyse der Lactongruppe. Verseifung der Estergruppe im Reaktionsprodukt und anschließende Hydrogenolyse ergab kristallisiertes L-*allo*Hydroxyprolyl-glycin.

### Racemisierung

Zahn weist wiederholt auf die Racemisierungs-Tendenz von Serin und seinen Derivaten hin. Daft und Coghill<sup>31</sup> berichten über eine rasche Racemisierung in Bariumhydroxyd. In 2N Natronlauge<sup>103</sup> (26°) beträgt indessen die Abnahme der Drehung innert 24 Stunden nur rund 10%. Zahn und Gerstner<sup>103</sup> benzoylieren deshalb nach der alten Vorschrift von Sörensen<sup>92</sup> und erhalten dabei ein Benzoyl-L-serin vom Smp. 122° und  $[\alpha]^{26} +48,5^\circ$  ( $c = 1$  in 95% EtOH). Durch Racematspaltung (Brucinsalze) dargestelltes Benzoyl-L-serin besitzt nach Fry<sup>44</sup> einen Doppelschmelzpunkt 130° und 147–149° und  $[\alpha]_D +43,6^\circ$  ( $c = 1$  in 95% EtOH). Die Nacharbeitung der Vorschrift von Fry lieferte in unseren Händen reines N-Benzoyl-L- bzw. D-serin vom Smp. 149,5–150,5°,  $[\alpha]^{24} +45,0 \pm 1^\circ$  ( $c = 1$  in 95% EtOH). Ein Material mit denselben Daten wird durch Benzoylierung von L-Serin in Gegenwart von Magnesiumoxyd und wäßrigem Aceton als Lösungsmittel in 60%iger Ausbeute erhalten.

Carbobenzoxy-L-serinester soll mit überschüssigem Hydrazinhydrat racemisches Hydrazid liefern; mit unterschüssigem Hydrazinhydrat erhalten Zahn und Schnabel<sup>87</sup> partiell racemisiertes Material. Derselben Schwierigkeit sind die genannten Autoren bei der Reaktion zwischen Hydrazinhydrat und Carbobenzoxy-L-seryl-glycinester bzw. Carbobenzoxy-L-seryl-glycyl-L-alanin-ester begegnet. Es ist unter diesen Umständen einigermaßen überraschend, daß wir unter den extrem basischen Bedingungen der Aminoacyl-lagerungs-Reaktion bisher keine Racemisierungen beobachtet haben.

### Peptide von Hydroxy-aminosäuren

Die Zusammenstellung erfolgte auf Grund der Angaben in Current Chemical Papers (Oktober 1956 – August 1958) und schließt damit an die Zusammenstellung von Goodman und Kenner<sup>47</sup> an. Angeführt sind nur die in der zitierten Arbeit beschriebenen Endprodukte. Die senkrechten Trennungsstriche innerhalb der Sequenzen deuten an, aus welchen Komponenten die Endprodukte bereitet wurden. Die darunterstehenden Buchstaben kennzeichnen alphabetisch fortlaufend die Reihenfolge, in welcher die Peptidbindungen geschlossen wurden. Die Synthesenmethoden sind durch Abkürzungen über dem Trennungsstrich angegeben: *Anh* bedeutet Anhydridsynthese durch ein gemischtes Anhydrid mit einer Carbonsäure oder einem Kohlensäure-halbesther, *S-Anh* und *P-Anh* durch gemischte Anhydride mit Schwefelsäure bzw. Phosphorsäure, *c-Anh* durch Aminolyse eines cyclischen Anhydrids einer Dicarbonsäure; *CDI* Carbodiimid-Methode; *Az* Azidmethode; *Cl* Säurechlorid-Methode; *Lac* Aminolyse eines  $\gamma$ -Hydroxyamino-säure-lactons; *PA* Phosphorazo-Methode; und *PP* die Verwendung von Pyrophosphit als Reagenz.

Das Symbol „Ser(P)“ wird hier für den Phosphoryl-serin-Rest,  $-\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{CH}_2\cdot\text{O}\cdot\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2)\cdot\text{CO}-$  benützt. *Bz* ist Benzyl, *Bzo* Benzoyl, *Cbz* Carbobenzoxy, *Cpo* Cyclopentylloxycarbonyl, *Tos* Tosyl

Tabelle III

## Dipeptide

<sup>CDI</sup> H-Thr D-Ala-OH <sup>99</sup>	<sup>PA, Az</sup> H-Tyr Gly-OH <sup>102,106</sup>	<sup>Anh</sup> H-Ala alloThr-OH <sup>14</sup>
<sup>CDI</sup> H-alloThr D-Ala-OH <sup>99</sup>	<sup>Az</sup> H-Tyr Glu-OH <sup>64,106</sup>	<sup>Anh</sup> H-Norleu alloThr-OH <sup>14 **</sup>
<sup>Lac</sup> H-DL-alloHylys DL-Ala-OH <sup>107</sup>	H-Ser His-OH <sup>75</sup>	<sup>Anh</sup> H-Phe alloThr-OH <sup>14</sup>
<sup>CDI, Az</sup> H-DL-Ser Arg-OH <sup>104</sup>	<sup>CDI</sup> Cbz-His( <i>Im</i> -Cbz) Ser(OBz)-OMe <sup>1</sup>	<sup>CDI</sup> Cbz-His( <i>Im</i> -Cbz) Thr-OMe <sup>1</sup>
<sup>Az</sup> H-Ser(P) Glu-OH <sup>81</sup>	<sup>Anh</sup> Cpo-Val Ser-OH <sup>67</sup>	<sup>PA</sup> [H-Cy(S-) Tyr-OH] <sub>2</sub> <sup>102</sup>
<sup>Lac</sup> H-alloHypro Gly-OH <sup>77</sup>	<sup>CDI, Az</sup> H-Arg DL-Ser-OH <sup>104</sup>	<sup>P-Anh</sup> Cbz-Gly Tyr-OEt <sup>29</sup>
<sup>Lac</sup> H-D-alloHypro Gly-OH <sup>77</sup>	<sup>Az</sup> H-Gly DL-Ser(P)-OH <sup>41</sup>	<sup>PA</sup> H-Gly Tyr-OH <sup>102</sup>
<sup>Lac</sup> H-DL-alloHylys Gly-NH <sub>2</sub> <sup>107</sup>	<sup>S-Anh</sup> Bzo-Gly DL-Ser-OMe <sup>81</sup>	<sup>c-Anh</sup> H-Glu Tyr-OH <sup>64,106</sup>
<sup>Az, Anh, CDI</sup> H-DL-Ser(P) Gly-OH <sup>41,81</sup>	<sup>Anh</sup> Cpo-DL-Ileu DL-Ser-OMe <sup>67</sup>	<sup>PA</sup> H-Ileu Tyr-OH <sup>102</sup>
<sup>Az</sup> Cbz-DL-Ser Gly-OEt <sup>81</sup>	<sup>PA</sup> H-DL-Ser DL-Ser-OH <sup>48 *</sup>	

## Tripeptide

<sup>Az</sup> H-Glu-Tyr DL-Ala-OH <sup>106</sup>	<sup>Az</sup> H-Gly-Tyr Gly-OH <sup>106</sup>	H-Ser His Leu-OH <sup>75</sup>
<sup>Az</sup> H-Gly-Tyr Asp-OH <sup>106</sup>	<sup>Az</sup> H-Tyr-Gly Glu-OH <sup>106</sup>	H-Gly-Tyr DL-Ser-OH <sup>106</sup>
<sup>CDI</sup> H-Ser Gly-Gly-OH <sup>4,5</sup>	<sup>Az</sup> H-Gly-Tyr Glu-OH <sup>106</sup>	H-DL-Ser-Gly Tyr-OH <sup>106</sup>
<sup>Anh</sup> H-Gly DL-Ser(P) Gly-OH <sup>41</sup>	<sup>Az</sup> H-Gly-Tyr Leu-OH <sup>106</sup>	H-Gly-Tyr DL-Val-OH <sup>106</sup>

## Tetrapeptide

<sup>Cl, Anh</sup> H-Tyr Phe Glu(NH <sub>2</sub> ) Asp(NH <sub>2</sub> )-OH . HBr <sup>61</sup>	<sup>Anh</sup> Cpo-Gly β-Ala-Leu-D-Thr-OH <sup>67</sup>
--	--

## Pentapeptide

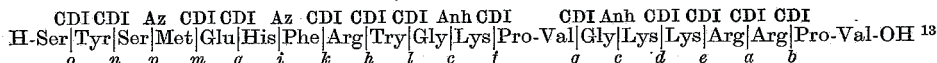
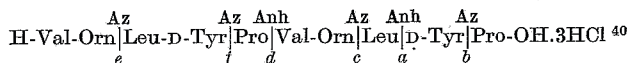
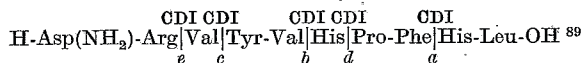
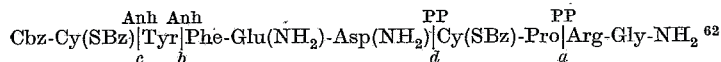
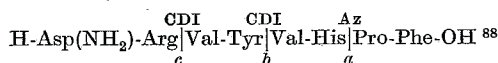
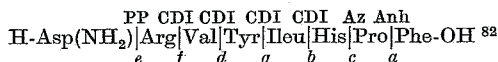
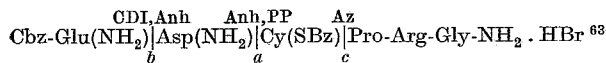
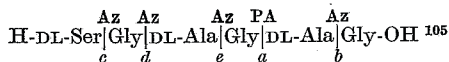
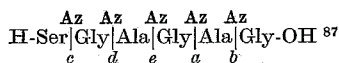
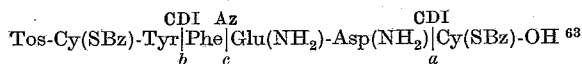
<sup>Anh</sup> Cbz-Cy(SBz)-Tyr Phe Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-OH <sup>60</sup>	<sup>Az, CDI</sup> H-Ser His Leu Val Glu-OH <sup>68,74</sup>
<sup>Anh</sup> Cbz-Cy(SBz) Tyr Phe-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub> <sup>60</sup>	<sup>CDI</sup> H-Thr His Leu-Val-Glu-OH <sup>69</sup>

\* Diastereomeren-Gemisch

\*\* Hemihydrat

Peptide der Hydroxyaminosäuren

Hexapeptide und höhere Polypeptide



Literatur

1. Akabori S., Okawa K., Sakiyama F.: *Nature* 181, 772 (1958).
2. Avaeva S. M., Botvinik M. M.: *Ž. obšč. chim.* 26, 2329 (1956); *Chem. Abstr.* 51, 4946i (1957).
3. Baer E., Maurukas J.: *J. Biol. Chem.* 212, 25 (1955).
4. Baer E., Maurukas J., Clarke D.: *Canad. J. Chem.* 34, 1182 (1956).
5. Baer E., Maurukas J., Clarke D.: *J. Biol. Chem.* 228, 181 (1957).
6. Bailey J. L.: *Biochem. J.* 60, 173 (1955).
7. Bamann E., Trapmann H., Schnegrad A.: *Chem. Ber.* 88, 1726 (1955).
8. Barnden R. L., Evans R. M., Hamlet J. C., Hems B. H., Jansen A. B. A., Trevett M. E., Webb G. B.: *J. Chem. Soc.* 1953, 3733.
9. Bergmann M., Miekeley A.: *Z. physiol. Chem.* 140, 128 (1924).
10. Bergmann M., Miekeley A.: *Ann.* 458, 40 (1927).
11. Bergmann M., Delis D.: *Ann.* 458, 76 (1927).
12. Blau K., Waley S. G.: *Biochem. J.* 57, 538 (1954).
13. Boissonnas R. A., Guttman S., Waller J.-P., Jaquenoud P.-A.: *Experientia* 12, 446 (1956).
14. Botvinik M. M., Avaeva S. M., Noskova N. B.: *Ž. obšč. chim.* 26, 2325 (1956); *Chem. Abstr.* 51, 4945i (1957).
15. Botvinik M. M.: *Ž. obšč. chim.* 23, 1617 (1953); *Chem. Zentralblatt* 1955, 563.
16. Bremner I. M.: *Biochim. et Biophys. Acta* 20, 579 (1956).
17. Brenner M., Rüfenacht K., Sailer E.: *Helv. Chim. Acta* 34, 2102 (1951).
18. Brenner M., Rüfenacht K.: Bisher nicht veröffentlicht.
19. Brenner M., Zimmermann J. P., Wehrmüller J., Quitt P., Photaki I.: *Experientia* 11, 397 (1955).
20. Brenner M., Zimmermann J. P., Quitt P., Schneider W., Hartmann A.: *Helv. Chim. Acta* 40, 604 (1957).

21. Brenner M., Zimmermann J. P., Wehrmüller J., Quitt P., Hartmann A., Schneider W., Beglinger U.: *Helv. Chim. Acta* 40, 1497 (1957).
22. Brenner M., Zimmermann J. P.: *Helv. Chim. Acta* 40, 1933 (1957).
23. Brenner M., Wehrmüller J.: *Helv. Chim. Acta* 40, 2374 (1957).
24. Brenner M., Quitt P.: *Chimia* 11, 342 (1957).
25. Brenner M., Zimmermann J. P.: *Helv. Chim. Acta* 41, 467 (1958).
26. Brenner M., Tamm R., Quitt P.: *Helv. Chim. Acta* 41, 763 (1958).
27. Brenner M., in: *Ciba Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic and Cytotoxic Properties*, S. 157. Churchill, London 1958.
28. Clayton D. W., Farrington I. A., Kenner G. W.: *J. Chem. Soc.* 1957, 1398.
29. Cramer F. D., Gärtner K. G.: *Chem. & Ind. (London)* 1958, 560.
30. Crawhall J. C., Elliott D. F.: *Biochem. J.* 61, 264 (1955).
31. Daft S. F., Coghill R. D.: *J. Biol. Chem.* 90, 341 (1931).
32. Desnuelle P., Bonjour G.: *Biochim. et Biophys. Acta* 7, 451 (1951).
33. Desnuelle P., Casal A.: *Biochem. et Biophys. Acta* 2, 64 (1948).
34. Elliott D. F.: *J. Chem. Soc.* 1949, 589.
35. Elliott D. F.: *J. Chem. Soc.* 1949, 592.
36. Elliott D. F.: *J. Chem. Soc.* 1950, 62.
37. Elliott D. F.: *Biochem. J.* 50, 542 (1952).
38. Elliott D. F.: *Ann. Repts on Progr. Chem.* 50, 277 (1953).
39. Elliott D. F.: *Ciba Foundation Symposium on the Chemical Structure of Proteins*, S. 129. Churchill, London 1953.
40. Erlanger B. F., Curran V. V., Kokowsky N.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1128 (1958).
41. Fölsch G.: *Acta Chem. Scand.* 12, 561 (1958).
42. Fölsch G., Mellander O.: *Acta. Chem. Scand.* 11, 1232 (1957).
43. Frankel M., Halmann M.: *J. Chem. Soc.* 1952, 2735.
44. Fry E. M.: *J. Org. Chem.* 15, 438 (1950).
45. Fry E. M.: *J. Org. Chem.* 15, 802 (1950).
46. Fürst G.: *Dissertation*. Universität München, 1957.
47. Goodman M., Kenner G. W.: *Advances in Protein Chem.* 12, 465 (1957).
48. Grassmann W., Wunsch E., Deufel P., Zwick A.: *Chem. Ber.* 91, 538 (1958).
49. Harrington C. R., Pitt Rivers R. V.: *Biochem. J.* 38, 417 (1944).
50. Harris J. I., Cole R. D., Pon N. G.: *Biochem. J.* 62, 154 (1956).
51. Hartmann A.: *Dissertation*. Universität Basel, 1957.
52. Hörmann H., Grassmann W., Wunsch E., Preller H.: *Chem. Ber.* 89, 933 (1956).
53. Hudson C. S., Neuberger A.: *J. Org. Chem.* 15, 24 (1950).
54. Iselin B., Feurer M., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 38, 1508 (1955).
55. Iselin B., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* 39, 57 (1956).
56. Johnson D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3636 (1953).
57. Jones D. C., Taylor A. W. C.: *Quart. Revs* 1950, 207.
58. Josefsson L., Edman P.: *Biochim. et Biophys. Acta* 25, 614 (1957).
59. Josefsson L.: *Arkiv Kemi* 12, 183 (1958).
60. Katchalski E., Sela M.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5284 (1953).
61. Katsoyannis P. G., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4482 (1956).
62. Katsoyannis P. G., Gish D. T., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4516 (1957).
63. Katsoyannis P. G., Gish D. T., Hess G. P., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2558 (1958).
64. Kollonitsch J., Hajós A., Gábor V.: *Chem. Ber.* 89, 2288 (1956).
65. Linstead R. P., Owen L. N., Webb R. F.: *J. Chem. Soc.* 1953, 1211.
66. McCord T. J., Ravel J.-M., Skinner C. H., Shive W.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3762 (1958).
67. McKay F. C., Albertson N. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686 (1957).
68. Merryfield R. B., Woolley D. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4646 (1956).
69. Merryfield R. B.: *J. Biol. Chem.* 232, 43 (1958).
70. Moore J. A., Dice J. R., Nikolaidis E. D., Westland R. D., Wittle E. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2884 (1954).
71. Nikolaidis E. D., Westland R. D., Wittle E. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2887 (1954).
72. Oesterberg R.: *Nature* 179, 476 (1957).
73. Okawa K.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 30, 110 (1957).
74. Okawa K.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 31, 88 (1958).
75. Okawa K.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 30, 976 (1957).
76. Overall B. G., Petrov V.: *J. Chem. Soc.* 1955, 232.
77. Patchett A. A., Witkop B.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 185 (1957).

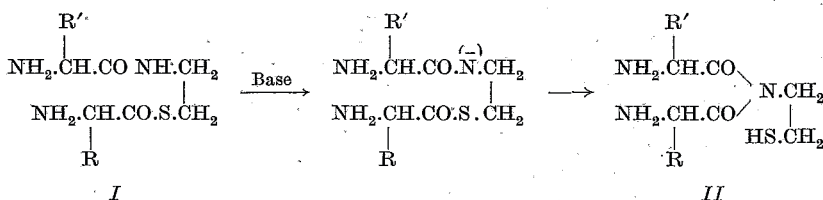
*Peptide der Hydroxyaminosäuren*

78. Plapinger R., Wagner-Jauregg T.: *J. Am. Chem. Soc.* *75*, 5757 (1953).
79. Plattner P. A., Boller A., Frick H., Fürst A., Hegedüs B., Kirchensteiner H., Majnoni S., Schläpfer R., Spiegelberg H.: *Helv. Chim. Acta* *40*, 1531 (1957).
80. Reitz H. G., Ferrel R. E., Olcott H. S., Fraenkel-Conrat H.: *J. Am. Chem. Soc.* *68*, 1024 (1946).
81. Riley G., Turnbull J. H., Wilson W.: *J. Chem. Soc.* 1957, 1373.
82. Rittel W., Iselin B., Kappeler H., Riniker B., Schwyzer R.: *Helv. Chim. Acta* *40*, 614 (1957).
83. Sakami W., Toennies G.: *J. Biol. Chem.* *144*, 203 (1942).
84. Sanger F.: *Advances in Protein Chem.* *7*, 21 (1952).
85. Schlögl K., Wessely F., Wawersich E.: *Monatsh.* *84*, 705 (1953).
86. Schnabel E., Zahn H.: *Monatsh.* *88*, 646 (1957).
87. Schnabel E., Zahn H.: *Ann.* *614*, 141 (1958).
88. Schwyzer R., Iselin B., Kappeler H., Riniker B., Rittel W., Zuber H.: *Helv. Chim. Acta* *41*, 1287 (1958).
89. Schwyzer R., Iselin B., Kappeler H., Riniker B., Rittel W., Zuber H.: *Helv. Chim. Acta* *41*, 1273 (1958).
90. Sheehan J. C., Goodman M., Hess G. P.: *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 1367 (1956).
91. Skinner C. G., McCord T. J., Ravel M., Shive W.: *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 2412 (1956).
92. Sörensen S. P. L., Andersen A. C.: *Z. physiol. Chem.* *56*, 297 (1908).
93. Vaughan J. R., Osato R. L.: *J. Am. Chem. Soc.* *73*, 5553 (1951).
94. Velluz L., Amiard G., Heymès R.: *Bull. soc. chim. France* 1955, 1283.
95. Weber R., Schmidt S.: Bisher nicht veröffentlicht.
96. Wieland T., Wirth L.: *Chem. Ber.* *82*, 468 (1949).
97. Wieland T., Bernhard H.: *Ann.* *572*, 190 (1951).
98. Wieland T., Heinke B.: *Ann.* *599*, 70 (1956).
99. Winitz M., Bloch-Frankenthal L., Izumiya H., Birnbaum S. M., Baker C. G., Greenstein J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 2423 (1956).
100. Witkop B.: *Experientia* *12*, 372 (1956).
101. Witkop B.: *Angew. Chem.* *70*, 577 (1958).
102. Wunsch E., Fries G., Zwick A.: *Chem. Ber.* *91*, 542 (1958).
103. Zahn H., Gerstner W.: *Chem. Ber.* *88*, 1731 (1955).
104. Zahn H., Diehl J. F.: *Z. Naturforsch.* *12b*, 85 (1957).
105. Zahn H., Schnabel E.: *Ann.* *604*, 62 (1957).
106. Zahn H., Ziegler K.: *Ann.* *610*, 132 (1958).
107. Zahn H., Zürn L.: *Ann.* *613*, 76 (1958).
108. Zahn H., Zürn L.: *Chem. Ber.* *91*, 1359 (1958).
109. Zervas L., Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* *77*, 5351 (1955).

## Diskussion

zu dem Referat von M. BRENNER

WIELAND: Wir haben auch eine Art von Einlagerungsreaktion studiert. Unser damaliger Grundversuch war der, daß wir ein Amid des Cysteamins herstellten, bei dem am Schwefel der Rest einer zweiten Aminosäure angebracht ist (*I*). Nun weiß man, daß die CO-S Bindung zu den energiereichen Bindungen zählt, so daß in alkalischer Lösung — und hier ist lange nicht so starkes Alkali notwendig — die Deprotonisierung dieser Amidgruppe ausreichen sollte um den Carbo-nylkohlenstoff des zweiten Aminoacylrests zu substituieren; als Zwischenprodukt wäre dann ein Diaminoacylimid *II* zu formulieren.



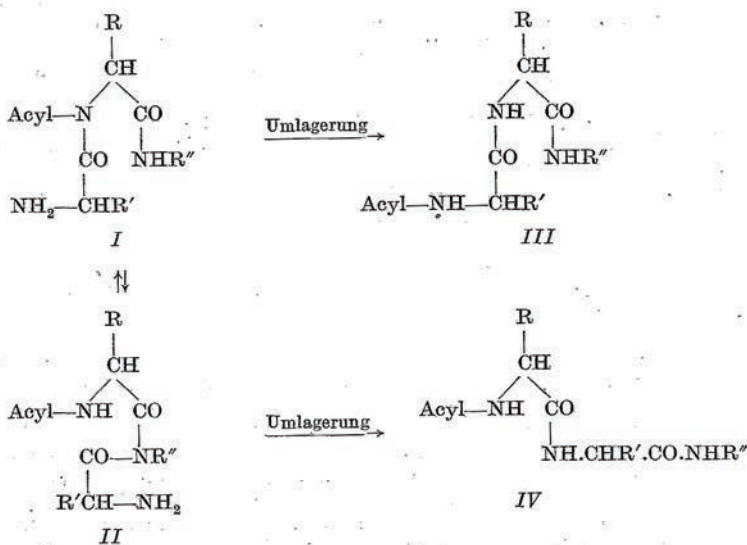
Nun haben wir diese Verbindung, die wir später auch ohne die Thioäthyl-Seitenkette synthetisiert haben, mit verschiedenartigen Aminosäuren unter der Einwirkung ganz schwach basischer Katalysatoren — das geht in wäßriger Bicarbonatlösung — umgelagert; und zwar in dem Sinn, daß es sich bemerkbar macht, daß die beiden aktivierten Amidbindungen zum Zug kommen können, indem der eine Acylrest (mit R) auf den Stickstoff des zweiten oder der Acylrest Nummer 2 (mit R') auf den Stickstoff des ersten übertragen wird [siehe Schema (?) auf Seite 9]. Was dabei herauskommt, ist eine Sequenz, bei der einmal die Aminosäure mit R die erste Position einnimmt, oder eine Sequenz bei der diese beiden Reste vertauscht sind. Zur Erklärung der Reaktion hat es mir genügt, ein Di-aminoacyl-imid anzunehmen. Herr Brenner hat, wie Sie vorhin gesehen haben, ein etwas komplizierteres Zwischenprodukt formuliert. Ich glaube, er hat auch chemische Anhaltspunkte dafür, daß solche ringförmige Verbindungen tatsächlich entstehen, wenigstens im Falle der Salicyl-Verbindungen.

BRENNER: Da sich vorläufig niemand sonst zum Wort meldet, seien mir einige ergänzende Ausführungen gestattet. An den Befunden von Herrn Wieland ist natürlich in keiner Weise zu zweifeln. Meiner Meinung nach liegen aber praktisch und theoretisch verschiedene Ausgangssituationen vor. Man kann deshalb nicht ohne Vorbehalte vergleichen. Die Acylwanderung, welche zur Bildung von Diacylimiden führt, erfolgt bei den Wieland'schen Substanzen über einen 5-Ring; bei unseren Verbindungen ist das erforderliche Zwischenprodukt ein 6-Ring, gleichgültig, ob die Aminoacyl-Einlagerung sich direkt oder über ein Diacylimid abspielt. Über die relative Beständigkeit der betreffenden Ringe ist nichts bekannt. Es ist aber in diesem Zusammenhang auffällig, daß beim O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid keine Acylwanderung zum Serin-Stickstoff unter schließlicher Bildung von Benzoylglycyl-serinamid, wohl aber Aminoacyl-Einlagerung zu Benzoylseryl-glycinamid erfolgt. Der intermediäre 6-Ring scheint also dem 5-Ring gegenüber bevorzugt zu sein. Analogieschlüsse über sein Verhalten sind deshalb nur mit Vorsicht zu ziehen.

Nun hat Herr Wieland bei seinen schönen Untersuchungen u. a. gezeigt, daß ein Diacylimid durch intramolekulare Wanderung eines der beiden Acylreste vom Imidstickstoff zu einem im Molekül benachbarten Amidstickstoff ein neues, isomeres Diacylimid bilden kann, usw. Sowie also im Laufe einer Umsetzung ein Diacylamid der Struktur *I* oder *II* auftritt, sind wegen des wechselseitigen Überganges  $I \rightleftharpoons II$  mindestens zwei isomere Endprodukte *III* und *IV* zu erwarten. Betrachten wir nun nochmals das O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid. Im Sinne von Wieland könnte daraus durch Wanderung des Glycylrestes sowohl das Diacylimid *Ia* (Wanderung zum Serin-Stickstoff) als auch das Diacylimid *IIa* (Wanderung zum Ammoniak-Stickstoff) entstehen. Zudem sollten *Ia* und *IIa* ineinander umwandelbar sein. Umlagerung von *Ia* + *IIa* müsste ein Gemisch von Benzoylglycyl-serinamid (*IIIa* aus *Ia*) und Benzoylseryl-glycinamid (*IVa* aus *IIa*) liefern. Experimentell haben wir keinen Hinweis für die Bildung von Benzoylglycyl-serinamid (*IVa*)

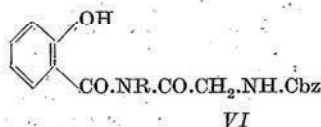
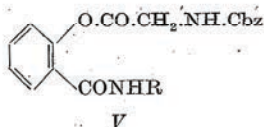
Peptide der Hydroxyaminosäuren

gefunden. Auch bei keinem anderen Umlagerungsbeispiel aus unseren bisherigen Arbeiten ist die Entstehung von Isomerengemischen dieser Art festgestellt worden. Der Nachweis von isomeren Beimengungen ist allerdings nicht immer einfach. Viele unserer Umsetzungen verlaufen aber so sauber und offenbar eindeutig, daß ich geneigt bin, gerade dies als ein Indiz für einen Mechanismus aufzufassen, bei dem keine Diacylimide als Zwischenprodukte auftreten. Bezüglich weiterer Indizien sei auf die in meinem Referat zitierte Literatur verwiesen.



$a : \text{Acyl} = \text{Bzo}, R = \text{CH}_2\text{OH}, R' = R'' = \text{H}$

Ich will indessen nicht verhehlen, daß wir trotz aller Hinweise bisher keinen Beweis für die Existenz der postulierten bicyclischen Zwischenprodukte beibringen konnten. Wir sind sogar teilweise eindeutig auf Diacylimide gestossen! So ist die von uns ursprünglich als O-Glycyl-salicylsäureamid (*Va*) bezeichnete Verbindung zweifellos das N-Isomere (*VIa*). In anderen Fällen, z. B. beim O-Glycyl-salicylsäuremethyramid (*Vb*) scheint das N-Isomere (*VIb*) nicht existenzfähig zu sein. In der aliphatischen Reihe ist die eindeutige Konstitutionszuordnung der Ausgangsmaterialien schwieriger. Wir halten sie vorläufig für Ester, bemühen uns aber weiterhin um eine Abklärung.



$a : R = \text{H}, b : R = \text{CH}_3$

YOUNG: That should surely be easy to test, because you get a phenol test with ferric chloride.

BRENNER: We thought that too, but the reaction with ferric chloride is so indistinct that we were mistaken, and others had been mistaken before. We had to make a very systematic investigation to prove that substances of the type *Va* do not exist. If you substitute the amide nitrogen, as in *Vb*, such compounds are completely stable. You can't even make diacylimides with a substituent on the amide nitrogen as in *VIb*.

WIELAND: Ich wollte fragen, ob Herr Brenner wohl eine Erklärung dafür hat, daß im Falle des N-Methyls die Diaminoacylimid-Verbindung nicht stabil sein sollte.

BRENNER: Man kann sonst auf Grund von Modell-Betrachtungen mit Atom-Modellen verschiedener Provenienz viel von der Konstitution verstehen, gerade bei diesen Salicylsäure-Derivaten, aber im vorliegenden Fall finden wir keine Erklärung.

WIELAND: Noch eine Frage: lagert die Verbindung mit  $\text{NHCH}_3$ , also *Vb*, auch um?

BRENNER: Ja, das O-Glycyl-salicylsäure-methylamid lagert normal um. Inbezug auf den Mechanismus verdient noch das Folgende eine kurze Erwähnung. Das Diacylimid aus Glycin und Benzoosäure lagert glatt um, zur Hippursäure. Wenn man eine Substanz vom Typus *VIa* in ein basisches Medium gibt, wie wir es für die Umlagerung verwenden — und das ist wesentlich — dann beobachtet man eine sehr deutliche spektrale Veränderung; es entsteht etwas neues. Alle N-Acylsalicylsäureamide geben in Alkali Salze, die ein ganz anderes Spektrum haben als die konjugaten Säuren. Es muß dabei irgendeine kompliziertere Veränderung eintreten, und das ist unserer Meinung nach eben die Bildung von einem zweiten Sechsring. Diese Reaktionsstufe tritt bei der Umlagerung von Glycyl-benzamid nicht auf, könnte aber an der Umlagerung von Glycyl-salicylamid beteiligt sein.

WIELAND: Es läuft also darauf hinaus, daß die Bildung des zweiten Ringes vonstatten geht während der Übergangszustand, also das Zwischenprodukt der Diacylimidsynthese, noch stabil ist.

BRENNER: Zwischenprodukt, ja — nicht Übergangszustand.

WIELAND: Ja, Zwischenprodukt; im Prinzip läuft es ja auf Diacylimid hinaus, nur daß es nicht also solches in Erscheinung tritt, und der Stickstoff des einen eben die Carbonylgruppe des anderen angreift.

Vielleicht darf ich noch etwas anderes im Zusammenhang mit den Einlagerungsreaktionen sagen. Die Beobachtung, daß bei Cysteaminverbindungen ein externer Aminosäurerest sich in die Hauptkette einschieben kann, hat uns veranlasst, an Proteinen direkt solche Versuche durchzuführen. Unter der Annahme, daß dort manchmal Cysteingruppen sind, haben wir ein natives Protein mit dem Thiophenylester von radioaktivem Methionin umgesetzt — mit freier Aminogruppe. Der Thiophenylester ist ein Aminoacylierungsreagens, und wenn man ein Protein, z. B. Milchsäuredehydrogenase oder Ovalbumin oder Lactoglobulin oder irgend ein anderes, mit dieser Verbindung bei pH 8 längere Zeit stehen läßt, nimmt das Protein etwa 20–25 Methioninreste in Bindung auf. Jetzt war zu sehen, ob die Methioninreste, wie vorher in Modellversuchen, in die Kette hineinwandern könnten und sich irgendwo darinnen befinden. Diese Versuche sind negativ verlaufen. Der Nachweis ist leicht: Man wäscht natürlich vorher alles überschüssige Methionin aus und hat dann ein Protein, in dem radioaktives Methionin fest inkorporiert ist. Man spaltet dieses modifizierte Protein mit irgendeiner Protease; wir haben Subtilisin benützt und haben die radioaktiven Peptide papierelektrophoretisch getrennt. Dies gibt eine Anzahl von radioaktiven Peptiden, ungefähr zwanzig, davon sind sechs recht stark ausgeprägt. Wir haben uns nur mit diesen sechs beschäftigt, die wurden eluiert und dann nach Edman abgebaut. Wenn jetzt das Methionin in der Hauptkette liegt, dann müßte man einmal Methionin in der Mitte der Peptide finden. Unser Versuch zeigte aber, daß das Methionin endständig ist, und zwar endständig an die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins gebunden. Es reagiert also, soweit wir es sagen können, die aktivierte Aminosäure mit dem Eiweiß vorwiegend unter Acylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins, und es ist keinerlei Anhaltspunkt für einen nachträglichen Einbau festgestellt worden. In diesem Zusammenhang noch eine recht interessante Beobachtung von H. Waelsch, die er gerade in Wien vorgetragen hat.\* Sie betrifft die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins. Waelsch hat in Leber ein Enzym entdeckt, welches an Casein den Schwund von Glutaminresten verursacht. Das Protein enthält Glutaminreste und wenn man es mit dem Enzym aus Leber einige Zeit lang inkubiert, dann verschwinden diese Amidgruppen. Sie lassen sich auch für andere Amide enzymatisch austauschen. Wenn man z. B. hier ein Phenyläthylamin zugibt, wie Mezcalin, so erhält man gebundenes fremdes Amin in Form des Amids. Wenn man aber das externe Amin wegläßt, so schwindet doch die Aminogruppe, und gleichzeitig verschwinden die  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins. So ist also hier die Annahme gerechtfertigt, daß intramolekular im Protein die  $\epsilon$ -Aminogruppen mit den Amidgruppen des Glutamins unter Austausch reagieren. Solche intramolekulare enzymatische Proteinreaktionen sind, glaube ich, recht wichtig. Es taucht nun die Frage auf, inwieweit überhaupt  $\gamma$ -Peptidbindungen bzw.  $\epsilon$ -Lysinbindungen in natürlichem Protein vorkommen und was ihre Funktion ist.

SCHEMJAKIN: In den letzten Jahren haben wir auch einige solche O,N- und S,N-Peptide der Hydroxy- und Mercaptoaminosäuren synthetisiert. Die Synthese dieser Verbindungen ist aber oft sehr schwer und führt zu unkristallisierbaren Produkten. Wie ich hier schon bemerkt habe, hat unlängst in unserem Institut Frau Schutschukina gefunden, das O,N-Peptide der Hydroxyaminosäuren bei Einwirkung von Acylaminosäuren auf die entsprechenden N-Peptide in Gegenwart von Carbodiimid in geringen Mengen von Pyridin synthetisiert werden können. Unter diesen

\* Siehe Clarke D. D., Mycek M. S., Neidle A., Waelsch H.: Arch. Biochem. Biophys. 79, 338 (1959).

Bedingungen gelingt es z. B. O,N-Peptide des Serins und auch der Salicylsäure in kristallinischem Zustande in 80–85% Ausbeute zu synthetisieren. Die erhaltenen Verbindungen haben wir weiter für chemische und biochemische Untersuchungen benützt. Jetzt untersuchen wir die Grenzen der Anwendbarkeit dieser Methode auf verschiedene Hydroxy- und Mercaptoaminosäuren. Wir versuchen auch, mit Frau Schtschukina, die biochemischen Bedingungen zu finden, welche vielleicht die von Prof. Brenner entdeckte Aminoacyl-Einlagerung bei solchen Systemen hervorrufen könnten. Wenn man diese Umwandlungen im Falle der O,N-Peptide des Serins chemisch durchgeführt, dann muß man unter sehr drastischen Bedingungen arbeiten (Alkoholate oder Natrium in Ammoniak), da hier kein planares System vorliegt. Es ist möglich daß unter gewissen biochemischen Bedingungen diese Aminoacyl-Einlagerung leichter von statten geht, und wir suchen jetzt solche enzymatische Systeme, welche diese Umwandlung hervorbringen könnten.

RUDINGER: Herr Brenner, Sie haben mir einen großen Schreckeingejagt mit den Umlagerungsreaktionen. Sie sagten ja, daß sie durch Ionisierung der Amidgruppe ausgelöst werden — durch Deprotonisierung — und es soll dann gehen, wenn die zwei betroffenen Aminoacylreste nahe an einander stehen. Was geschieht nun, wenn man z. B. ein cyclisches Peptid synthetisiert und mit Natrium in flüssigem Ammoniak Tosylgruppen abspaltet? Da dabei Natriumamid gebildet wird und die Peptidbindungen acider sind, werden doch da bestimmt Anionen der Amidbindungen entstehen; und da die Peptidbindungen auch transannular in nächste Nähe gebracht werden — wäre das nicht ein geradezu idealer Fall für solche Umlagerungen?

BRENNER: Die Bedingungen sind in der Tat gefährlich, und alles hängt davon ab, was bei der Spaltung mit Natrium im flüssigem Ammoniak sonst noch geschieht. Ich möchte in diesem Zusammenhang noch einmal auf die Carbobenzyloxyverbindungen zu sprechen kommen. Wenn Natriumamid in flüssigem Ammoniak die Isomerisierung von Dipeptid-amiden bewirkt, dann ist dieses offensichtlich das Natrium-Ammoniak-Verfahren zur Abspaltung von Carbobenzyloxygruppen außerordentlich verdächtig. Wir haben deshalb Carbobenzyloxy-glycyl-phenylalaninamid, und auch Carbobenzyloxy-phenylalanyl-glycinamid mit Natrium in flüssigem Ammoniak decarbobenzyliert, und haben keine Spur von einer Isomerisierung entdeckt! Was ist der Grund? Er liegt vermutlich darin, daß wir keine freie Aminogruppe erhalten, sondern die Carbaminsäure. Diese ist als Natriumsalz in flüssigem Ammoniak so beständig, daß nichts weiter passiert.

WÜNSCH: Ich habe auf dem Wiener Kongress mit Mitarbeitern von Herrn Professor Tuppy gesprochen. Sie sagten mir, sie hätten bei der Synthese von Oxytocin über die Tosylverbindungen zahlreiche Nebenprodukte bekommen, die sie durch säulenchromatographische Abtrennung sichtbar machen konnten. Das würde eventuell auf so eine Sache hindeuten.

RUDINGER: Man müßte da wissen, ob das Produkte der letzten Stufe, der Reduktion sind.

WÜNSCH: Ja, bei der Reduktion der Tosylgruppe mit Natrium in flüssigem Ammoniak.

RUDINGER: Die Ausbeuten der Reduktion, nach der Aktivität gemessen, liegen um 40% herum. Wir können nicht garantieren, was mit dem Rest geschehen ist, wir haben noch keine respektable Analyse des Produkts gemacht, man ist ja hauptsächlich an der Aktivität interessiert.

WÜNSCH: Etwas, was ich noch selbst gemerkt habe, ist folgendes: Man kann Tosyl-DL-serin doch sehr leicht mit Brucin in Antipoden spalten [Stoll A., Petrzilka T.: *Helv. Chim. Acta* 35, 589 (1952)]. Wenn man dann anschließend von dem Tosyl-L-serin den Tosylrest mit Natrium in flüssigem Ammoniak abspaltet, erhält man in dem Rohprodukt nicht nur L-Serin; nach der chromatographischen Analyse sind da auch andere ninhydrin-positive Bestandteile dabei.

BRENNER: Tosyl-threonin wird durch Natrium in flüssigem Ammoniak vollkommen zerstört.

WÜNSCH: Bei dem Serin geht das schon — aber die Ausbeute ist einmal geringer und zweitens sind da chromatographisch noch andere Produkte dabei.

SCHEMJAKIN: Herr Brenner, in Ihrer hypothetischen Zwischenverbindung, wo ein Stickstoffatom in der Brücke steht, kann man wahrscheinlich auch ein Sauerstoffatom verwenden, und da kann man wahrscheinlich diese Umlagerungen auch mit Hydroxysäuren führen. Haben Sie nicht diese Reaktion studiert?

BRENNER: Ja, ein Hydroxyacylrest anstelle eines Aminoacylrestes ist denkbar. Experimente liegen nicht vor.

WIELAND: Noch eine Frage, Herr Brenner: Haben Sie schon bei einem Tripeptid mit Natrium in flüssigem Ammoniak versucht, ob da die Umlagerung stattfindet?

BRENNER: Ja, aber wir sind noch nicht sicher, und ich will gleich sagen: es scheint, als ob es schlecht ginge.

### Diskussion

WIELAND: Wenn es mit einem Dipeptid-amid geht, müßte es eigentlich auch mit dem freien Tripeptid gehen.

BRENNER: Es geht nicht einmal mit dem freien Dipeptid!

RUDINGER: Aber das Tripeptid ist doch ein Dipeptid-amid, nicht wahr?

BRENNER: Das ist es schon, aber es enthält auch eine saure Gruppe. Nach deren Ionisierung haben wir natürliche Mühe durch Dissoziation eines Amid-Wasserstoffs noch eine zweite negative Ladung in das Molekül hineinzubringen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn die Aminoacyl-Einlagerung in diesem Falle ausbleibt.

WIELAND: Es wäre eigentlich sehr beruhigend, wenn das nicht so leicht ginge: denn unsere ganzen synthetischen Versuche wären ja manchmal vergebens, wenn auf einer Stufe plötzlich eine unkontrollierbare Umlagerung eintreten könnte.

BRENNER: So furchtbar leicht kann es in der Tat nicht gehen. Das beweisen die Synthesen, die bis jetzt gemacht worden sind — es sei denn, daß trotz Herrn Rudinger thermodynamische Stabilitäten eine Rolle spielten! Es ist jedenfalls interessant, der Frage nachzugehen, und ich möchte die Synthetiker bitten, ihre Augen in dieser Beziehung ein bißchen offen zu halten.

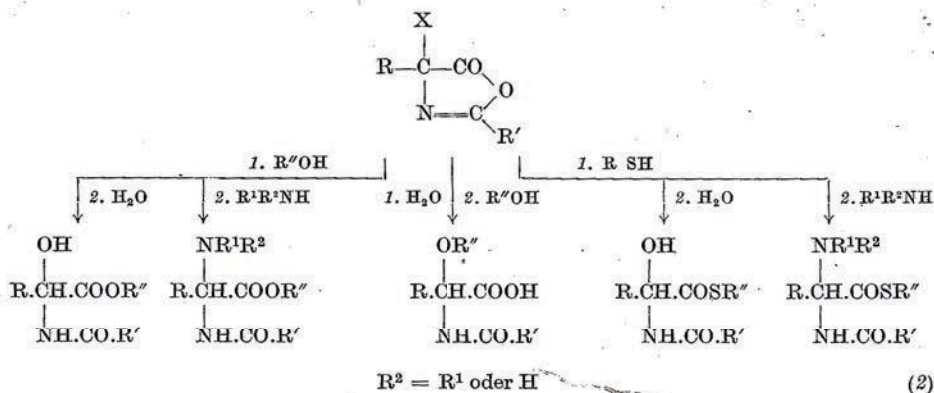
WÜNSCH: Der früher sehr viel gebrauchte Rest zur Maskierung der offenen Hydroxyl-funktionen, die O-Acylierung, ist ja gar nicht so einfach dann anzuwenden, wenn man z. B. mit aktiven Estern arbeitet, denn auch diese O-acylierten Hydroxyaminosäuren sind ja in gewissem Grad aktive Ester, die ebenfalls in der Lage sind ihre O-Acylgruppe zu übertragen. Zum Beispiel kann man O-Acyltyrosin ohne weiteres verwenden um die Acylgruppe auf die Aminokomponente zu übertragen.

BRENNER: Bei den O-Acylverbindungen von Serin und Threonin riskiert man Eliminierung, und auch Acylübertragung. Ich möchte eher abraten, Acetylserin u. dgl. zu verwenden. Es ist zwar über ein Polyacetylserin berichtet worden, das über den Leuchs'schen Körper erhalten wurde [Frankel H., Halmann M.: *J. Chem. Soc.* 1952, 2735]; zu meinem Erstaunen scheint dieses Polyacetylserin eine beständige Verbindung zu sein.



Schemjakin:

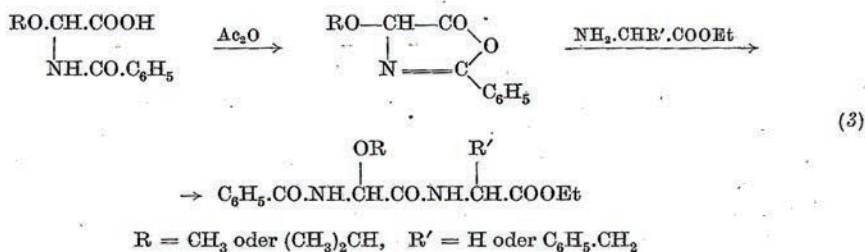
Thiosäuren (Alkohol oder Mercaptan, dann Wasser), Ester der  $\alpha$ -Alkyl-amino- $\alpha$ -acylamino-säuren und -thiosäuren (Alkohol oder Mercaptan, danach Amin) und andere Verbindungstypen.



Die Synthese zahlreicher  $\alpha$ -substituierter  $\alpha$ -Acylaminosäuren ermöglichte es, mit der Untersuchung der Eigenschaften und Umwandlungen dieser Stoffe zu beginnen.

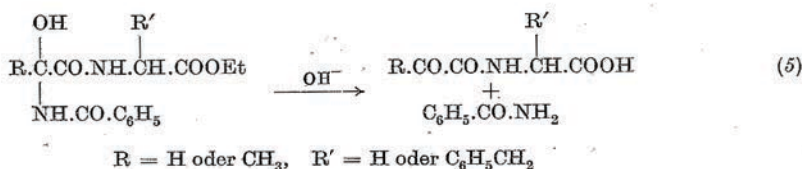
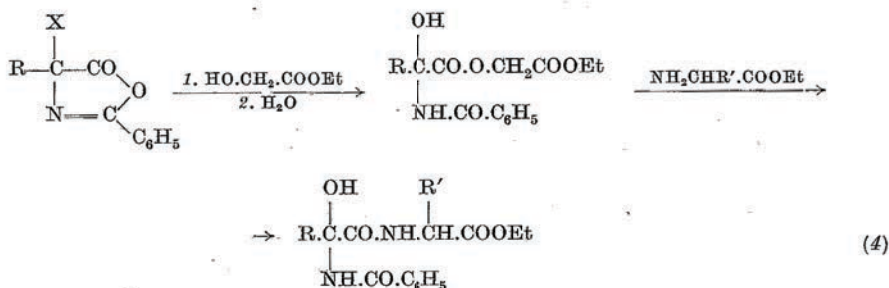
Besonders interessant erschien die Aufklärung der Möglichkeiten der Synthese von Peptiden, die Reste von  $\alpha$ -substituierten  $\alpha$ -Aminosäuren enthalten. Zur Einführung der letzteren als N-Endaminosäuren erwiesen sich folgende Methoden als brauchbar: die Oxazolonemethode<sup>7</sup>, die Methode der aktivierten Ester<sup>7</sup> und die Carbodiimidmethode.

Die erste von diesen Methoden erlaubt es, Peptide, welche  $\alpha$ -Alkoxy- $\alpha$ -acylamino-säurereste enthalten, mühelos zu synthetisieren, aber nur dann, wenn diese substituierten Acylaminosäuren sich leicht in die entsprechenden Oxazolone umwandeln lassen, wie z. B.  $\alpha$ -Alkoxy- $\alpha$ -benzoylamino-säuren. Derartige Oxazolone geben mit Aminosäureestern die Dipeptidester (3). In den letzteren kann man die Estergruppe verseifen ohne den Rest der  $\alpha$ -Alkoxy- $\alpha$ -acylamino-säuren anzugreifen.

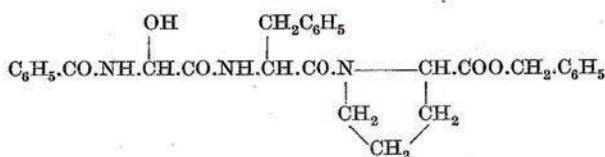
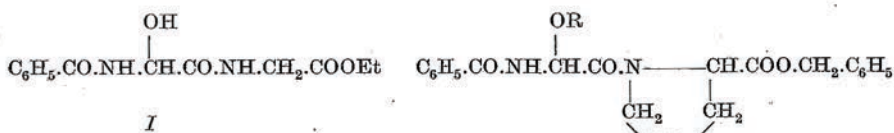


Zur Einführung von  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -acylamino-säureestern in Peptide ist die Methode der aktivierten Ester mit Erfolg angewandt worden. Es zeigte sich, daß aktivierte Ester der  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -acylamino-säuren leicht durch die Einwirkung von Glykolsäureester (und Wasser) unmittelbar auf die Halogenoxazolone erhalten werden können. Andererseits reagieren diese

aktivierten Ester dank ihrer großen Reaktionsfähigkeit schon unter milden Bedingungen mit Aminosäureestern unter Bildung von Dipeptidestern (4).



Es muß noch bemerkt werden, daß bei vorsichtiger Hydrolyse derartiger Peptide in alkalischem Medium die Reste der  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -acylamino-säuren sich nach (5) in  $\alpha$ -Aldehyd- resp.  $\alpha$ -Ketosäurereste verwandeln, wobei keine Aufspaltung der Peptidbindung erfolgt. Dank der Anwesenheit der Carbonylgruppe können die so erhaltenen Verbindungen zur unmittelbaren Einführung von Peptidresten in verschiedene Moleküle Anwendung finden. Andererseits sind solche carbonylhaltigen Peptide von Interesse, da sie unter den Hydrolyseprodukten einiger in der Natur vorkommender Peptide, z. B. Lactotyrim, vorgefunden worden sind.



Die Carbodiimidmethode haben wir mit Erfolg zur Darstellung von Peptiden angewendet, die Reste von  $\alpha$ -Hydroxy- und  $\alpha$ -Alkoxy- $\alpha$ -acylamino-säuren enthalten. In den beiden Fällen wurde die Reaktion mit Cyclohexylcarbodi-

*Schemjakin:*

imid in Methylenchlorid durchgeführt. Nach dieser Methode haben wir einige Peptidester (z. B. *I—III*) synthetisiert, darunter auch ein Tripeptid (*III*), dessen Aminosäurezusammensetzung dem Peptidbestandteile der Mutterkornalkaloide nahe ist (s. a. die später veröffentlichten Mitteilungen<sup>8-10</sup>).

Literatur

1. Siehe z. B. Glenn A. L.: *Quart. Revs* 8, 192 (1954).
2. Woolley D. W.: *J. Biol. Chem.* 176, 1299 (1948).
3. Abraham E. P., Newton G. G. F.: *Ciba Symposium on Amino Acids with Antimetabolic Activity*, S. 205. Churchill, London 1958.
4. Bell M. R., Johnson J. R., Wildi B. S., Woodward R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1001 (1958).
5. Tschaman E. S., Schemjakin M. M.: *Ž. obšč. chim.* 25, 1350 (1955).
6. Schemjakin M. M., Tschaman E. S., Denisowa L. I.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 106, 675 (1956).
7. Schemjakin M. M., Tschaman E. S., Ravdel G. A.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 107, 706 (1957).
8. Chemiakine M. M., Tschaman E. S., Denisowa L. I., Ravdel G. A., Rodionow W. J.: *Bull. soc. chim. France* 1959, 530.
9. Schemjakin M. M., Denisowa L. I., Tschaman E. S.: *Iswest. Akad. Nauk SSSR, Otdel. Chim. Nauk* 1959, 680.
10. Schemjakin M. M., Antonow W. K.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 129, 349 (1959).

### Diskussion

zum dem Referat von M. M. SCHEMJAKIN

BRENNER: Darf ich fragen, ob Sie ein Derivat von  $\alpha$ -Hydroxyalanin mit freier Hydroxylgruppe und acylierter Aminogruppe herstellen konnten, ohne daß Wasser abgespalten wurde? Sind diese Substanzen beständig?

SCHEMJAKIN: Ja, sie sind beständig, und wenn man sie, selbstredend ohne Einwirkung von anderen Reagenzien, bis zu 120–130° erhitzt, verlieren sie kein Wasser. Wenn man aber mit Alkalien darauf einwirkt und die Acylaminogruppe verseift wird, dann werden sie gleich gespalten. Sie sind sehr unbeständig gegenüber Alkalien, ein wenig beständiger gegenüber Säuren, und relativ beständig beim Erhitzen. Man kann nicht die Acylaminogruppe verseifen, ohne die Hydroxygruppe zu schützen. Wenn man die Hydroxygruppe schützt, dann kann man die Aminogruppe freisetzen.

BRENNER: Und haben Sie in allen Fällen durch Abbau Brenztraubensäure bekommen?

SCHEMJAKIN: Ja, in allen Fällen.

BRENNER: Ich habe noch eine Frage. Umsetzung Ihres Bromazlactons mit Alkohol gibt den  $\alpha$ -Ethoxyaminosäureester; was geschieht, wenn man darauf ein proteolytisches Ferment einwirken läßt?

SCHEMJAKIN: Das haben wir nicht versucht.

RUDINGER: Kann man das Halogen nach dem Öffnen des Azlactonringes auch gegen eine Acyloxygruppe austauschen?

SCHEMJAKIN: Nein, das kann man nicht.

RUDINGER: Es spaltet Halogenwasserstoff ab?

SCHEMJAKIN: Ich weiss nicht was geschieht, aber man bekommt polymerisierte Verbindungen und die Acyloxygruppe kann man nicht einführen.

## SPEZIELLE PROBLEME DER SYNTHESE CYCLISCHER PEPTIDE\*

M. ROTHE

*Institut für Faserstoff-Forschung, Teltow-Seehof, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin  
und Institut für organische Chemie, Universität Halle*

Die Erkenntnis, daß einige biochemisch hochaktive Peptide, wie das Insulin und die Mutterkornalkaloide, cyclische Bereiche im Molekül enthalten oder aber überhaupt Ringstruktur besitzen, wie die Hypophysenhormone Oxytocin und Vasopressin und eine Anzahl von Peptidantibiotika, hat in jüngster Zeit in steigendem Maße eine Bearbeitung von Methoden zur Synthese derartig gebauter Verbindungen nach sich gezogen und den Wunsch nach Klärung des Zusammenhangs zwischen Konstitution und biologischer Wirksamkeit wachgerufen. Darüber hinaus ist eine genauere Untersuchung der Stereochemie makrocyclischer Peptide wegen der möglichen Bildung von Einschlußverbindungen und besonders im Hinblick auf die räumliche Anordnung der Aminosäuren in Proteinen von wesentlichem Interesse.

Das Problem besteht prinzipiell im Aufbau offenkettiger Peptide mit aktivierter Carboxyl- und freier Aminogruppe — oder umgekehrt — nach bekannten Methoden und anschließend deren innermolekularer Verknüpfung durch eine neue Peptidbindung zum Ring unter Reaktionsbedingungen, die eine Polykondensation hintanhaltend, also unter Anwendung des Zieglerischen Verdünnungsprinzips.

Trotz der allgemeinen Fortschritte in der Methodik der Peptidsynthese innerhalb des letzten Jahrzehnts ist jedoch eine Übertragung der bekannten Verfahren auf die Gewinnung von Ringpeptiden bisher nur in wenigen Fällen gelungen, so daß man hier immer noch am Anfang steht.

So sind bisher überhaupt nur sehr wenige Vertreter dieser Stoffklasse bekannt geworden, die beschriebenen Ringschlußverfahren beschränken sich meist auf ein einziges Beispiel, und systematische Syntheseveruche fehlen noch ganz. Die Ursache hierfür liegt in der schwierigen Zugänglichkeit und Identifizierbarkeit fast aller Ringpeptide, letztere bedingt durch die Abwesenheit charakteristischer reaktionsfähiger Endgruppen und die deshalb beträchtliche chemische Stabilität. Dementsprechend soll im folgenden der Versuch unternommen werden, das bisher vorliegende Material vor allem auf die allgemeine Anwendbarkeit der Cyclisierungsmethoden zu untersuchen sowie kurz auf die Identifizierungsmöglichkeiten cyclischer Peptide hinzuweisen, von deren Ausgestaltung und Verbesserung der weitere Fortschritt dieses Gebietes wesentlich abhängt.

Die in der Natur vorkommenden ringförmigen Peptide lassen sich entsprechend der verschiedenartigen chemischen Verknüpfung ihrer Bausteine in zwei Gruppen einteilen. Cyclopeptide, deren Aminosäuren ausschließlich peptidartig miteinander verbunden sind, bezeichnet man nach einem Vorschlag von Schwyzer<sup>1</sup> als homodet (gleichartig verknüpft). Von ihnen soll hier haupt-

\* V. Mitteilung über cyclische Peptide.

sächlich die Rede sein. Die physiologisch wichtigsten Ringpeptide, die bereits genannten Oxytocin, Insulin, die Mutterkornalkaloide usw., enthalten dagegen außerdem noch Disulfid- oder Esterbindungen im Ring und heißen dementsprechend ungleichartig verknüpfte — heterodete — Ringpeptide. Auf die Verknüpfung solcher Bindungen innerhalb des Peptidmoleküls wird am Schluß eingegangen.

### Bildungsweisen cyclischer Peptide

Der einfachste Weg zur Gewinnung ringförmiger Peptide sollte in der Wasserabspaltung von linearen Peptiden beim Erhitzen bestehen. Er läßt sich jedoch nur bei  $\omega$ -Aminosäuren bzw. deren Peptiden in bestimmten Ausmaß verwirklichen, während  $\alpha$ -Aminosäuren und ihre Peptide in wenig übersichtlicher Reaktion Polypeptide und auch Diketopiperazine bilden. Erhitzt man dagegen  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure oder ihre linearen Peptide auf Temperaturen zwischen 200° und 300°, so entstehen in einer Gleichgewichtsreaktion neben viel Polyamid und beträchtlichen Mengen an Caprolactam etwa 3% an niedermolekularen cyclischen Peptiden<sup>2-4</sup>, von denen wir kürzlich<sup>5</sup> die ersten acht Glieder papierchromatographisch einwandfrei nachweisen konnten, nämlich alle polymerhomologen Ringe vom 14-gliedrigen Cyclodipeptid bis herauf zum 63-gliedrigen Cyclononapeptid der Aminocaprinsäure.

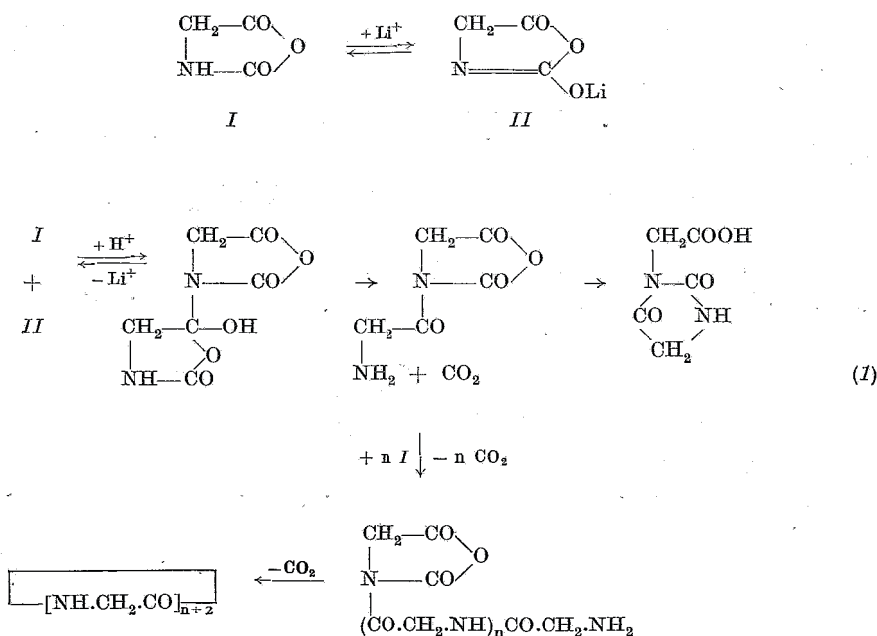
Wie aus Abb. 1\* zu ersehen ist, lassen sich die genannten Ringspeptide im absteigenden Papierchromatogramm im Lösungsmittelsystem Tetrahydrofuran-Petroläther-Wasser ausgezeichnet voneinander trennen. Auf der linken Seite des Doppelstreifens ist ein Methanolextrakt des Polykondensats aufgetragen, während sich auf der rechten Seite die mitgelaufenen authentischen Verbindungen vom Cyclodipeptid, das am weitesten wandert, bis zum Cyclopentapeptid befinden. Sie wurden nach den später noch ausführlich zu besprechenden Ringschlußmethoden auf eindeutigen Wege synthetisiert. Lineare Aminocaprinsäurepeptide bleiben — wie ersichtlich — am Startpunkt liegen und können somit nicht stören. Durch Übertragung dieses Verfahrens auf die Cellulosesäule gelingt eine Trennung und Reingewinnung der Ringe in gut kristallisierter Form im präparativen Maßstab (Abb. 2\*).

Ein weiteres Verfahren zur Auftrennung wenigstens der niederen Ringe bis zum 35-gliedrigen Cyclopentapeptid haben wir in der fraktionierten Molekulardestillation bei 250—300°, verbunden mit anschließender fraktionierter Kristallisation, gefunden<sup>6</sup>, wobei lineare Anteile vorher zweckmäßig mit Hilfe von Ionenaustauschern entfernt werden<sup>7</sup>. Hierbei destillieren die Ringpeptide mit steigender Temperatur erwartungsgemäß entsprechend ihrer Ringgröße unzersetzt über, das Cyclodipeptid schon kurz oberhalb 200°, das -tetrapeptid erst bei 280—290°<sup>4-6</sup>. Das beschriebene Beispiel zeigt, wie man auch sehr komplexe Gemische von Ringpeptiden mit Hilfe der modernen Methoden der organischen Chemie auftrennen kann.

Erwähnt sei noch, daß die gleichen Cyclopeptide auch bei der Polymerisation von Caprolactam in Gegenwart von Wasser oder aber unter Feuchtigkeitsausschluß mit geringen Mengen an metallischem Natrium entstehen. Dagegen ist die innermolekulare Wasserabspaltung von linearen Peptiden unter Bildung des entsprechenden Ringpeptids vom gleichen Polymerisationsgrad erst in einem einfachen Fall gelungen, nämlich beim Erhitzen des linearen Dipeptids der Aminocaprinsäure in starker Verdünnung in Diäthylphosphit als hochsiedendem Lösungsmittel mit einer Ausbeute von 25% an Cyclodipeptid<sup>8</sup>.

\* Siehe Bildbeilage nach Seite 152.

Eine weitere Bildungsweise ringförmiger Peptide ohne Anwendung des Verdünnungsprinzips besteht in der Reaktion von  $\alpha$ -Aminosäure-N-carbonanhydriden mit anorganischen Salzen oder auch tertiären Aminen in polaren Lösungsmitteln, wie Dimethylformamid oder Nitrobenzol. Hierbei bildet sich ebenfalls ein schwierig zu trennendes Gemisch polymerhomologer Ringpeptide neben den entsprechenden Derivaten der Hydantoin-(3)-essigsäure. Sie lassen sich durch Heißwasserextraktion und mit Hilfe von Ionenaustauschern isolieren, aber nur das am schwersten lösliche Cyclohexaglycyl konnte — ausgehend von Glycin-N-carbonanhydrid — in reinem kristallisierten Zustand in etwa 6% Ausbeute erhalten werden<sup>9</sup> (vgl.<sup>10</sup>). Das Schema (I) zeigt den wahrscheinlichen Reaktionsverlauf nach Ballard und Mitarbeitern<sup>9</sup>.



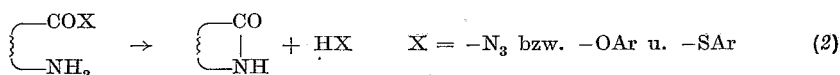
Nach Komplexbildung zwischen Kation und Anhydrid und Abgabe eines Protons ist das Stickstoff-Atom genügend basisch, um mit einem zweiten Molekül Anhydrid unter Dimerisierung zu reagieren. Das unter Kohlendioxyd-Abspaltung gebildete Aminoacylderivat kann nun entweder zur Hydantoinessigsäure cyclisieren oder aber mit weiteren Anhydridmolekülen unter Kettenverlängerung und anschließendem Ringschluß Cyclopeptide bilden.

Die Reaktion ist in präparativer Hinsicht bisher nicht weiter bearbeitet worden, doch sollte die Anwendung verteilungschromatographischer Verfahren ähnlich wie bei der Auftrennung der Cycloaminocapronsäurepeptide hier wesentliche Fortschritte bringen. Dann aber verdient dieses relativ einfache Einstufenverfahren in bestimmten Fällen (Ringpeptide aus nur einer Aminosäure) gegenüber dem mühseligen Aufbau der Peptidketten und anschließenden Ringschluß Beachtung.

Zu den hier zu besprechenden Bildungsweisen ringförmiger Peptide zählt schließlich auch die basenkatalysierte intramolekulare Kondensation von Peptidestern in organischen Lösungsmitteln. Sie verläuft bereits bei Zimmertemperatur in alkoholischer Lösung mittels Ammoniak, primären, sekundären und tertiären Basen, gibt aber nur geringe Mengen an kristallisierten meist schwer löslichen cyclischen Produkten. Auf diese Weise erhielten Brockmann und Mitarbeiter<sup>11</sup> 1954 aus Glycyl-DL-alanyl-DL-phenylalaninmethylester neben höheren Peptiden die ersten kristallisierten Ringpeptide, die auf Grund der kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung in Phenol als Cyclotri- bzw. hexapeptid angesprochen wurden. P. W. G. Smith<sup>12</sup> beobachtete die Bildung von 3% an Cyclo(glycyl-glycyl-DL-prolyl) aus dem Tripeptid-äthylester in alkoholischem Triäthylamin innerhalb mehrerer Monate, wobei außerdem noch Hydrolysenprodukte und Diketopiperazine auftraten. Bei höherer Temperatur tritt diese Abspaltung von Diketopiperazinen vom Kettenende her nach Schramm und Restle<sup>13</sup> neben der Polykondensation stärker in der Vordergrund. Die Cyclisierung von Peptidestern ist also nicht verallgemeinerungsfähig, sondern gelingt anscheinend nur in bestimmten sterisch günstig gelagerten Fällen (Prolinpeptide; vgl. auch die besonders leichte Bildung von Diketopiperazinen des Prolins); jedoch können solche Produkte wegen ihrer schwierigen Nachweisbarkeit leicht übersehen worden sein.

### Syntheseverfahren cyclischer Peptide

Allgemein anwendbare Methoden zur Synthese ringförmiger Peptide benötigen viel energiereichere Peptidderivate als Ausgangsprodukte, die möglichst ohne Nebenreaktionen zur Amidverknüpfung führen. Bisher sind besonders zwei Verfahren erfolgreich angewendet und bei der Synthese einer Reihe von Cyclopeptiden erprobt worden, nämlich die Methode der „aktivierten Ester“ und die Azidmethode. Solche reaktionsfähigen Peptidderivate mit aktivierter Carboxylgruppe unterliegen bei Berücksichtigung des Verdünnungsprinzips leicht der innermolekularen Aminolyse durch die freie Aminogruppe des anderen Kettenendes unter Ringschluß nach (2).



Zu ihrer Synthese sind speziell drei Operationen durchzuführen. Zunächst muß die Peptidkette mit geeigneten Schutzgruppen aufgebaut werden, daraufhin die Carboxylgruppe in das Azid bzw. den „aktivierten Ester“ umgewandelt und schließlich die Aminoschutzgruppe unter milden Bedingungen wieder abgespalten werden, ohne daß eine Schädigung des energiereichen Esters eintritt.

Um bei diesem letzten Schritt ein sofortige Polykondensation auszuschießen, muß man die Abspaltung entweder bereits in hoher Verdünnung durchführen oder aber viel vorteilhafter die entstehende Aminogruppe durch Salzbildung sofort vorübergehend blockieren. Die kristallisierten Ester- bzw. Azidsalze, meist Hydrobromide oder -chloride, können dann außerdem einer Reinigung unterworfen werden, bevor sie unter Zusatz einer geeigneten organischen oder auch anorganischen Base in die Ringschlußreaktion eingesetzt werden.

Wenden wir uns zunächst der „Aktive-Ester-Methode“ zu, die in der Hand von Schwyzer<sup>14</sup> bereits zu der bedeutsamen Synthese des cyclischen Dekapeptid-Antibiotikums Gramacidin S geführt hat. Innerhalb dieser Methode stehen Erfahrungen dreier Laboratorien mit verschiedenen Estergruppen von abgestufter Reaktionsfähigkeit zur Verfügung, wie aus einer — erweiterten — Tabelle von Schwyzer<sup>15</sup> hervorgeht (Tab. I).

Tabelle I  
Cyclopeptide aus „aktivierten Estern“

Aktivierter Ester	Abspaltung der N-Schutzgruppe	Cyclopeptid	Bearbeiter
Carbobenzoxy-Schutzgruppe			
Carboxythio- methyl- Thiophenyl-	HBr-AcOH	c-Tetra- und -hexa-Gly-	Schwyzler <sup>1</sup>
	HBr-AcOH	c-Di- bis -hexa-ε-aminocaproyl- c-Di- bis -tetra-β-alanyl- c-Gly-Leu-Gly-Leu-Gly-	Rothe <sup>16</sup> Rothe <sup>17</sup> Kenner <sup>18</sup>
<i>p</i> -Nitrothio- phenyl- <i>p</i> -Nitrophenyl-	HBr-AcOH		
	HBr-AcOH	c-Di-ε-aminocaproyl- c-Val-Gly-Gly-Val-Gly-Gly- c-Di-ε-aminocaproyl-	Rothe <sup>16</sup> Rothe <sup>17</sup> Rothe <sup>16</sup>
2,4-Dinitro- phenyl- <i>p</i> -Methylsulfo- nylphenyl-	H <sub>2</sub> , Pd/C in CH <sub>3</sub> OH- HCl	c-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-	Schwyzler <sup>15</sup>
Trityl-Schutzgruppe			
Cyanmethyl- <i>p</i> -Nitrophenyl- <i>p</i> -Cyanphenyl-	HCl-CH <sub>3</sub> CN (80°) CF <sub>3</sub> COOH-H <sub>2</sub> O (0°) verd. HCl-AcOH	c-Tetra- und -hexa-Gly- Gramacidin S c-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly- c-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-	Schwyzler <sup>1</sup> Schwyzler <sup>14</sup> Schwyzler <sup>15</sup>

Angewendet wurden also bisher Peptidester von Cyanmethylalkohol<sup>1</sup>, *p*-Nitro<sup>14,16</sup> und 2,4-Dinitrophenol<sup>16</sup>, *p*-Cyanphenol und *p*-Methylsulfonylphenol<sup>15</sup> aus der Gruppe der O-Ester und ferner an Thioestern Peptidderivate von Thioglykolsäure<sup>1</sup>, Thiophenol<sup>16,17</sup> und *p*-Nitrothiophenol<sup>18</sup>. Sie alle vereinigen in sich die bekannten Vorteile der aktiven Ester: gute Kristallisationsfähigkeit und Lagerbeständigkeit sowie hohe Aminolysengeschwindigkeit. Letztere steigt nach Versuchen von Kenner<sup>19</sup> vom Thiophenyl- über den *p*-Nitrophenyl- zum *p*-Nitrothiophenylester auf das 16- bzw. 140-fache an. Ein besonderer Vorteil der Thioester ist ihre große Hydrolysenbeständigkeit<sup>20</sup>, während die O-Ester viel empfindlicher sind und besonders die 2,4-Dinitrophenylderivate z. T. schon in wäßriger Lösung hydrolysieren<sup>16,17,21</sup>.

Ihre Gewinnung gelingt auf verschiedenen Wegen. Während jedoch die Synthese aus Säurechloriden<sup>20</sup> oder gemischten Anhydriden<sup>20</sup> wegen der möglichen Racemisierung nur auf Peptide mit endständigem Glycin beschränkt ist, sind in jüngster Zeit neue Methoden bekannt geworden, welche die volle Erhaltung der optischen Aktivität mit hohen Ausbeuten verbinden. Es handelt

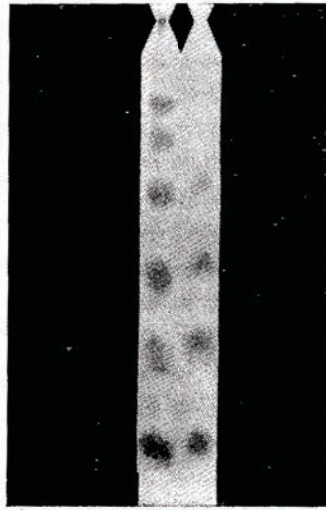
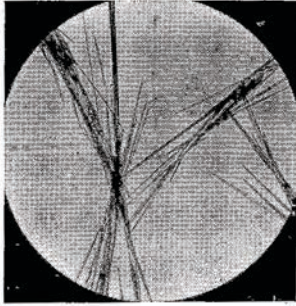


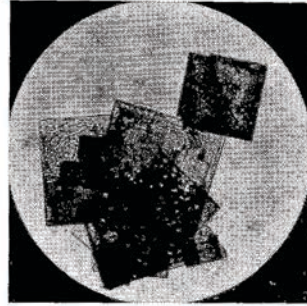
Abb. 1

Papierchromatogramm der Ringpeptide der  $\epsilon$ -Aminocapronsäure

Von oben nach unten, *rechts*: Cyclodipeptid bis -pentapeptid (authentisch), *links*: Cyclodipeptid bis -nonapeptid (aus Polymerisat isoliert). Schleicher-Schüll-Papier 2043b, 13 Stunden Durchlaufchromatogramm (absteigend) in Tetrahydrofuran-Petroläther-Wasser (186 : 14 : 10).  
Entwicklung: 7 min Chlor, 5 min Luft, 10 s Ammoniak, Tolidin-Kaliumjodid.



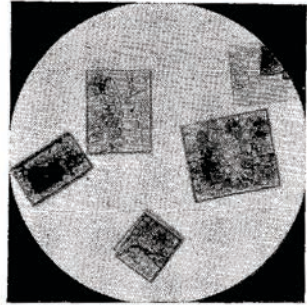
Cyclodipeptid (Hochtemperatur-Form)  
(70fach)



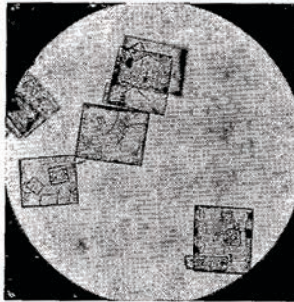
Cyclodipeptid (Tiefemperatur-Form)  
(70fach)



Cyclotripectid (50fach)



Cyclotetrapectid (70fach)



Cyclopentapeptid (100fach)

Abb. 2  
Cyclopeptide der  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure

sich hier um die Reaktion der Carbonsäuren mit Diarylsulfiten oder Triarylphosphiten<sup>22</sup> bzw. Triarylthiophosphiten<sup>19</sup>. Vor einiger Zeit<sup>16,17</sup> haben wir noch einen weiteren neuartigen Weg beschrrieben, der sich durch Einfachheit und Ergiebigkeit auszeichnet. Acylaminosäuren und -peptide lassen sich mit Phenolen und Mercaptanen mittels Dicyclohexylcarbodiimid in organischen Lösungsmitteln unter milden Bedingungen kondensieren. Innerhalb weniger Stunden entstehen bei Raumtemperatur neben etwa der theoretischen Menge an Dicyclohexylharnstoff sehr reine aktive Ester in Ausbeuten von meist über 90%. Unter dem katalytischen Einfluß tertiärer Basen, wie Pyridin, lassen sich auf diese Weise auch Cyanmethylester sowie Alkyl- und Benzylester herstellen. Elliott und Russell<sup>23</sup>, die kürzlich diese Reaktion, allerdings nur für die Gewinnung von *p*-Nitrophenylestern, anwandten, konnten auch nach anschließender Peptidsynthese insgesamt nur höchstens 3% Racemisierung nachweisen. Unser Verfahren hat vor der Diarylsulfitmethode den Vorteil, daß bei etwa gleichen Ausbeuten Carbodiimide viel besser zugänglich sind als jene Verbindungen.

Zur reversiblen Blockierung der NH<sub>2</sub>-Gruppe dienen der Carbobenzyloxy- oder der Tritylrest; ihre Entfernung gelingt nach bekannten Methoden mit den in Tabelle I angeführten Reagentien. Zur Ringschlußreaktion werden die gebildeten Salze der aktivierten Ester in absolutem Pyridin als Lösungsmittel oder in Dimethylformamid unter Zusatz von tertiärem Amin in hoher Verdünnung umgesetzt. Die besonders stabilen *p*-Nitrothiophenylester reagieren sogar in wäßriger Lösung in Gegenwart von Magnesiumoxyd, allerdings unter teilweiser Racemisierung. Diese Verbindungen und die ebenfalls hoch aktiven 2,4-Dinitrophenylester cyclisieren schon bei Raumtemperatur. In den übrigen Fällen wird bei 50–100° und bei den Thiophenylestern zur Erzielung hoher Ausbeuten bei kleinen Reaktionszeiten sogar in heißem Dimethylformamid gearbeitet. Die Konzentrationen betragen zweckmäßig 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-4</sup> mol/l Lösungsmittel, wenn man nicht nach dem Zutropfverfahren über einen langen Zeitraum arbeiten will. Noch verdünntere Lösungen sind nur bei der Gewinnung mittlerer Ringe mit 8–12 Ringatomen notwendig. Hier treten sonst nämlich zuerst zwei oder mehrere Estermoleküle zusammen, bevor der Ringschluß erfolgt. So konnten wir bei aktiven Estern des Di- $\beta$ -alanins in 10<sup>-3</sup>-molarer Lösung papierchromatographisch hauptsächlich Cyclotetrapeptid neben wenig des 8-gliedrigen Cyclodipeptids nachweisen<sup>24</sup>. Ähnlich werden beim Einsatz von Tripeptidestern unter Dimerisierung stets die cyclischen Hexapeptide erhalten<sup>1,15,24,25</sup>. Hier bilden sich allerdings aus sterischen Gründen auch bei größerer Verdünnung keine Cyclotripeptide, da diese entsprechend dem Aufbau am Kalottenmodell erhebliche Spannungen zeigen. Zur Aufarbeitung und Reinigung der Ringe hat man Ionenaustauscher, Säulenchromatographie, Gegenstromverteilung und Vakuumsublimation oberhalb 200° angewendet und dann stets ausgezeichnet kristallisierte Präparate erhalten. Die Ausbeuten liegen bei Peptiden mit günstiger Ringweite zwischen 40 und 75%.\*

Ein weiteres elegantes Cyclisierungsverfahren fand Sheehan<sup>26</sup>, als er Peptidazide in stark verdünnter, bicarbonathaltiger wäßriger Lösung bei 0° einige Tage stehen ließ. Diese Methode verdient wegen der guten Ausbeuten (40–60%) und des zu erwartenden Fehlens jeglicher Racemisierung

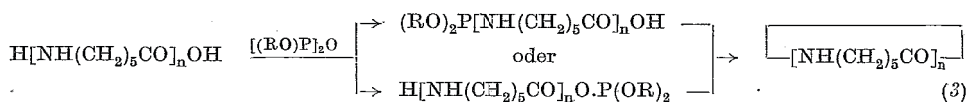
\* Auch die von uns bearbeiteten Cyclo-aminocaproyle wurden mit Ausbeuten von 50–75% erhalten.

besondere Beachtung. Die Gewinnung der Azidsalze beruht auf dem Befund von Hofmann und Magee<sup>27</sup>, daß freie Peptidhydrazide mit salpetriger Säure in das Azid übergeführt werden, ohne daß ein Angriff auf die Aminogruppe erfolgt. Beschrieben wurde bisher die Cyclisierung von Tri- und Hexaglycinazid, die beide Cyclohexaglycyl liefern<sup>28,29</sup>, sowie von Aziden der Poly-ε-aminocaprinsäuren<sup>30,31</sup>. Winitz und Fruton<sup>32</sup> gingen dagegen vom Carbobenzoxy-peptidazid aus und entfernten die Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung bei hoher Verdünnung. Das erhaltene amorphe angebliche Cyclotripeptid ist allerdings verschieden von dem inzwischen<sup>15</sup> nach der Estermethode gewonnenen und eindeutig identifizierten Ringpeptid. Eine eingehende Untersuchung von Heyns<sup>33</sup> zeigte überdies, daß Carbobenzoxy-tripeptidazide dabei hauptsächlich zum Carbobenzoxy-dipeptidamid abgebaut werden. Eine neue Ringschlußmethode bedient sich der altbekannten Peptidchloridhydrochloride. Wie wir fanden, lassen sie sich in absolutem Dimethylformamid auf Zusatz von Triäthylamin unter sehr milden Bedingungen (0°) cyclisieren. So konnten wir Cyclo-di-aminocaproyl sowie Cyclohexaglycyl aus Triglycinchlorid<sup>34</sup> unter Dimerisierung gewinnen (40 bzw. 10% Ausbeute). Entscheidend für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist die Qualität der eingesetzten Chloride. Jedoch steht das Verfahren hinter der Ester- oder Azidmethode wegen deren größerer Beständigkeit zurück.

Schließlich hat man auch gemischte Anhydride mit Kohlensäurehalbester für den Ringschluß heranzuziehen versucht<sup>35</sup>. Tatsächlich bildet sich dann aus Di-ε-aminocaprinsäure das leicht zu fassende Cyclodipeptid in geringer Ausbeute<sup>36</sup>, jedoch findet hierbei in der Hauptsache eine Einwirkung des Säurechlorids auf die Aminogruppe statt.

Besonderes Interesse beansprucht die Einwirkung von Carbodiimiden auf lineare Peptide, die unter Wasserabspaltung in wäßrig-alkoholischer Lösung schon unterhalb Zimmertemperatur erfolgt. Wieland<sup>37</sup> cyclisierte auf diese Weise ein Valin-hexapeptid in 45% Ausbeute. Das gleiche Produkt wird nach unseren Versuchen<sup>17</sup> auch aus dem entsprechenden Tripeptid nach der gleichen Methode erhalten. Jedoch stehen Versuche mit anderen Peptiden noch aus.

Schließlich haben wir<sup>24</sup> auch versucht, Ringpeptide durch Aktivierung der Aminogruppe zu erhalten, was den Vorteil der geringeren Racemisierungsgefahr hat. Dies erfolgte durch Einwirkung von Tetraäthylpyrophosphit<sup>38</sup> auf unsubstituierte lineare Peptide, wobei Bildung des erforderlichen reaktionsfähigen Peptidderivats — Phosphitamide oder aber gemischte Phosphorigsäureanhydride — und Ringschluß in einer einzigen Stufe hintereinander ablaufen (3). Als Lösungsmittel diente Diäthylphosphit. Den Einfluß der Reaktionsbedingungen zeigen Abb. 3 und 4 an Hand von Cyclisationsversuchen mit Di-ε-aminocaprinsäure. Wir haben diese Substanz gewählt, weil sich das zu erwartende Cyclodipeptid wegen seiner Schwerlöslichkeit und seines guten Sublimationsvermögens leicht und quantitativ isolieren läßt.



Erwartungsgemäß steigen die Ausbeuten bei Temperaturerhöhung stark an, ebenso mit Steigerung der Menge des Kondensationsmittels, so daß man

maximal auf 60% kommt. Wie weit sich das Verfahren auf Peptide von  $\alpha$ -Aminosäuren ausdehnen läßt, muß noch untersucht werden. Das sich ähnlich verhaltende Phosphorigsäure-äthylester-dichlorid reagiert mit Leucylglycylglycin unter Bildung von Leucylglycin-anhydrid, also unter Ketten-spaltung<sup>39</sup>.

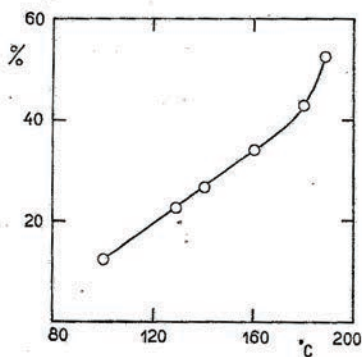


Abb. 3

Cyclisierung der Di- $\epsilon$ -aminocapronsäure in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur.  $10^{-3}$  Mol Tetraäthylpyrophosphit. Ordinate: Ausbeute (%). Abszisse: Reaktionstemperatur (°C).

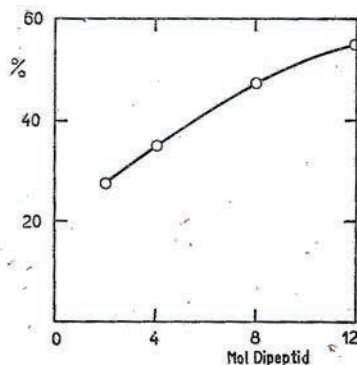
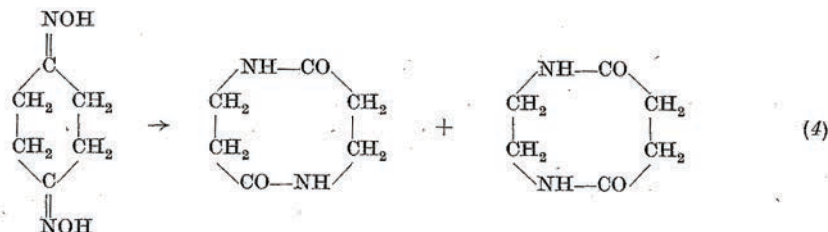


Abb. 4

Cyclisierung von Di- $\epsilon$ -aminocapronsäure in Abhängigkeit vom Pyrophosphit-Zusatz. Reaktionstemperatur 140°. Ordinate: Ausbeute (%), Abszisse: Mol Diäthylpyrophosphit pro Mol Dipeptid.

$10^{-3}$  Mol Di- $\epsilon$ -aminocapronsäure, 250 ml Diäthylphosphit, Reaktionszeit 2 Stunden.

Alle bisher angewendeten Methoden beruhen auf dem Prinzip, zunächst die Peptidkette aufzubauen und danach den Ring zu schließen. Geht man dagegen von einem bereits vorhandenen Ring aus, der einer geeigneten Reaktion unter Bildung eines Cyclopeptids unterworfen wird, so sollten vor allem mittlere Ringe mit 8–12 Ringatomen besser zugänglich sein, die sich auch nach dem Verdünnungsprinzip nur in geringen Ausbeuten bilden. Zwei hierher gehörende Reaktionen stellen die Schmidt'sche Umlagerung mehrwertiger Ringketone und die Beckmann'sche Umlagerung der entsprechenden Ketonoxime dar, mit deren Hilfe z. B. die Darstellung der Cyclodipeptide der homologen  $\omega$ -Aminosäuren aus symmetrischen ringförmigen Diketonen gangbar erscheint. Ihr prinzipieller Nachteil besteht darin, daß sie nach zwei Richtungen verlaufen können und deshalb Gemische zweier chemisch ähnlicher Reaktionsprodukte entstehen, nämlich außer den erwünschten Cyclodipeptiden noch Amide vom Diamin-dicarbonsäure-Typ [Schema (4)].



Beim einfachsten Fall, der Umlagerung des Cyclohexan-1,4-dions konnten wir im Gegensatz zu früheren Bearbeitern<sup>40,41</sup> das gesuchte Cyclodi- $\beta$ -alanyl sehr gut kristallisiert aus dem Dioxim mit Oleum oder vorteilhafter aus dem Diketon mit Stickstoffwasserstoffsäure in 25% Ausbeute erhalten<sup>24</sup>. Es war in allen Eigenschaften identisch mit dem durch Cyclisierung des linearen Dipeptids erhaltenen Produkt und enthielt nach der Totalhydrolyse keine Spur Äthylendiamin. In gleicher Weise reagiert nach Weygand<sup>43</sup> auch Succinylobernsteinsäure-diäthylester mit Stickstoffwasserstoffsäure unter Bildung eines Cyclodipeptids der Asparaginsäure in  $\beta$ -Verknüpfung sowie nach eigenen Versuchen auch Cyclodocosan-1,12-dion zum Cyclodipeptid der Aminoundecansäure.

### Synthesen heterodeter Cyclopeptide

Synthesen heterodeter Ringpeptide mit Esterbindungen sind bisher nicht durchgeführt worden. Auch die Gewinnung cyclischer Peptiddisulfide braucht nur kurz besprochen zu werden, da der Ringschluß bisher in allen Beispielen nach dem Verfahren erfolgte, das du Vigneaud<sup>44</sup> beim Oxytocin anwandte: Behandlung des entsprechenden S-Benzylderivats mit Natrium in flüssigem Ammoniak und Oxydation des entstehenden Dithiols zum Disulfid in verdünnter wäßriger Lösung bei pH 6,5 mittels eines Luftstroms<sup>45-49</sup>. Interessant sind Modellversuche von Rydon<sup>50</sup>, der zeigen konnte, daß bei der Oxydation von Cysteinyl-polyglycyl-cysteininen die Ringweite des entstehenden Disulfids von großem Einfluß ist (Tab. II). So bilden sich statt der kleineren Ringe nur deren (antiparallele) Dimere, während bei 3 und 4 innenständigen Glycinresten in zunehmendem Maße die monomeren Ringe entstehen und der 20-gliedrige Ring, wie er auch im Oxytocin und Insulin vorliegt, besonders bevorzugt ist.

Tabelle II

Oxydationsprodukte von L-Cysteinyl-polyglycyl-L-cysteininen<sup>50</sup>  
Angenäherte Ausbeuten; die Kursivzahlen geben die Zahl der Ringglieder an.

Anzahl der Glycinreste	0	1	2	3	4
Monomeres Ringdisulfid	8 —	11 —	14 15%	17 40%	20 90%
Dimeres Ringdisulfid	16 20%	22 80%	28 20%	34 55%	40 —
Trimeres Ringdisulfid	24 +	33 +	42 25%	51 —	60 —

### Identifizierung von Cyclopeptiden

Wegen der schon erwähnten schwierigen Charakterisierbarkeit cyclischer Peptide sollen abschließend noch die wichtigsten Identifizierungsmöglichkeiten kurz besprochen werden.

Viele Ringpeptide sind auch oberhalb 300° beständig und besitzen keinen definierten Schmelz- oder Zersetzungspunkt; alle sind sehr gut kristallisiert.

Die Abwesenheit von Endgruppen folgt eindeutig aus der potentiometrischen Titration sowie der Ultrarotaufnahme. Auf Einheitlichkeit der gewonnenen Präparate prüft man papyrographisch, am besten mit Hilfe der kürzlich von Smith<sup>12</sup> modifizierten — feuchten — Chlormethode, bei der sich auch sehr reaktionsträge Amidgruppen nachweisen lassen. Ein wichtiges Problem ist die Molekulargewichtsbestimmung. Bei der kryoskopischen Methode ist Phenol als Lösungsmittel ungeeignet. Wir konnten an Hand der Cyclo-aminocaproyle zeigen<sup>4</sup>, daß die erhaltenen Werte viel zu tief liegen und man erst durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung zu richtigen Ergebnissen kommt (Abb. 5). Viele Ringpeptide lassen sich aber nach Rast im Lactam der *p*-Aminohexahydrobenzoesäure bestimmen<sup>4,42</sup>, das die gleiche große Konstante wie Kampher besitzt. Neu ist die Verwendung von Dimethylsulfoxyd<sup>15</sup>, das ein ausgezeichnetes Lösevermögen besitzt. Die häufig angewandte Methode der isothermen Destillation ist leider sehr langwierig. Bei einfach zusammengesetzten Verbindungen läßt sich auch die papyrographische Verfolgung der Partialhydrolyse (Lithium- oder Bariumhydroxyd) zur Bestimmung der Ringgröße sehr gut verwenden. Das fragliche Ringpeptid muß dann die gleiche Bausteinzahl besitzen, wie das höchste der nachgewiesenen linearen Peptide. Dieses Verfahren führte auch zur eindeutigen Identifizierung von Cyclohexaglycyl<sup>9</sup>, das wie erwähnt stets aus den verschiedensten Triglycinderivaten entsteht. Aus diesem Grunde sollte die Identität aller bisher als Cyclotripeptide angesprochenen Substanzen erneut überprüft werden.

Für zukünftige Arbeiten muß noch darauf hingewiesen werden, daß die Entwicklung leistungsfähiger Cyclopeptidsynthesen über das eigentliche Gebiet hinaus auch Bedeutung für die Polypeptidchemie besitzt. Die hinsichtlich der Methode der Peptidverknüpfung und der Reaktionsbedingungen sehr empfindlichen Cyclopeptidsynthesen dürften nämlich wichtige Erfahrungen zur Gewinnung von genauer definierten Polypeptiden vermitteln, als das bisher meist der Fall ist.

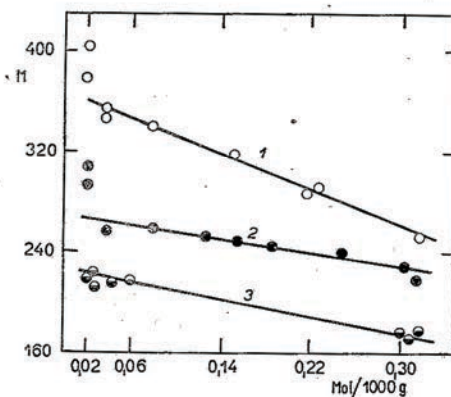


Abb. 5

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung von Cyclopeptiden der  $\epsilon$ -Aminocapronsäure in Phenol

1 Cyclodipeptid, 2 Cyclotripeptid, 3 Cyclotetrapeptid. Ordinate: Molekulargewicht, Abszisse: Mol Substanz/1000 g Lösungsmittel.

## Literatur

- Schwyzer R., Iselin B., Rüttel W., Sieber P.: *Helv. Chim. Acta* 39, 872 (1956).
- Schlack P., Kunz K., in P. Pummerer (Red.): *Chem. Textilfasern, Filme und Folien*, S. 629 ff; Enke, Stuttgart 1953.
- Hermans P. H.: *Rec. trav. chim.* 72, 798 (1953).
- Rothe L., Rothe M.: *Chem. Ber.* 88, 284 (1955).
- Zahn H.: *Angew. Chem.* 69, 270 (1957).
- Rothe L., Rothe M.: *Chem. Ber.* 88, 284 (1955).
- Heikens D.: *Rec. trav. chim.* 75, 1199 (1956).

8. Rothe M., Brünig H.: Bisher nicht veröffentlicht.
9. Ballard D. G. H., Bamford C. H., Weymouth F. J.: Proc. Roy. Soc. A. 227, 155 (1953); Nature (London) 174, 173 (1954).
10. Bilek L., Derkosch J., Michl H., Wessely F.: Monatsh. 84, 717 (1953).
11. Brockmann H., Tummes H., Metzsch F. A. v.: Naturwiss. 41, 37 (1954).
12. Smith P. W. G.: J. Chem. Soc. 1957, 3985.
13. Schramm G., Restle H.: Makromol. Chem. 13, 103 (1954).
14. Schwyzer R., Sieber P.: Angew. Chem. 68, 518 (1956); Helv. Chim. Acta 40, 624 (1957).
15. Schwyzer R.: Chimia 12, 90 (1958).
16. Rothe M., Kunitz F. W.: Angew. Chem. 68, 414 (1956); Ann. 609, 88 (1957).
17. Rothe M.: Tagungsbericht 1956 der Chem. Gesellschaft (DDR), Chem. Techn. 9, 59 (1957); Rothe M., Hoffmann H.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 18, 449 (1959).
18. Kenner G. W., Turner J. M.: Chem. & Ind. (London) 1955, 602.
19. Farrington J. A., Kenner G. W., Turner J. M.: Chem. & Ind. (London) 1955, 601.
20. Wieland T., Schäfer W., Bokelmann E.: Ann. 573, 99 (1951); 576, 104 (1952).
21. Wieland T., Jaenicke F.: Ann. 599, 125 (1956).
22. Iselin B., Rittel W., Sieber P., Schwyzer R.: Helv. Chim. Acta 40, 373 (1957).
23. Elliott D. F., Russell D. W.: Biochem. J. 66, 49 P (1957).
24. Rothe M.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 18, 449 (1959).
25. Kenner G. W.: Advances in Protein Chem. 12, 494 (1957).
26. Sheehan J. C., Richardson W. L.: J. Am. Chem. Soc. 76, 6329 (1954).
27. Hofmann K., Maggee M. Z.: J. Am. Chem. Soc. 71, 1515 (1949).
28. Bamford C. H., Weymouth F. J.: J. Am. Chem. Soc. 77, 6368 (1955).
29. Sheehan J. C., Goodman M., Richardson W. L.: J. Am. Chem. Soc. 77, 6391 (1955).
30. Zahn H., Determann H.: Chem. Ber. 90, 2176 (1957).
31. Zahn H., Kunde J.: Ann. 618, 158 (1958).
32. Winitz H., Fruton J. S.: J. Am. Chem. Soc. 75, 3040 (1953).
33. Heyns K., Walter W., Müller F.: Angew. Chem. 68, 617 (1956).
34. Rothe M., Eppert G., Brünig H.: J. prakt. Chem. 8, 323 (1959).
35. Boissonnas R. A., Schumann I.: Helv. Chim. Acta 35, 2229 (1952).
36. Zahn H., Rexroth E.: Z. anal. Chem. 148, 181 (1955).
37. Wieland T., Ohly K. W.: Ann. 605, 179 (1957).
38. Anderson G. W., Blodinger J., Welcher A. D.: J. Am. Chem. Soc. 74, 5309 (1952).
39. Kenner G. W., Turner J. M.: Advances in Protein Chem. 12, 488 (1957).
40. Mamlok L.: Bull. soc. chim. France 1956, 482.
41. Knunjanz I. L., Fabricznyi B. F.: Dokl. Akad. nauk SSSR 68, 701 (1949).
42. Wendt H.: Ber. 75, 425 (1942).
43. Weygand F., Dietrich H. J.: Chem. Ber. 87, 482 (1954).
44. Du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3115 (1954).
45. Boissonnas R. A., Guttman S., Jaquenoud P.-A., Waller J.-P.: Helv. Chim. Acta 38, 1491 (1955); 39, 1421 (1956).
46. Rudinger J., Honzl J., Zorál M.: Diese Zeitschrift 21, 202 (1956).
47. Velluz L., Amiard G., Bartos J., Goffinet B., Heymès R.: Bull. soc. chim. France 1956, 1464.
48. Lautsch W., Kraege H. J.: Chem. Ber. 89, 737 (1956).
49. Lautsch W., Schulz G.: Naturwiss. 45, 58 (1958).
50. Rydon H. N., Heaton G. S., Schofield J. A.: J. Chem. Soc. 1956, 3157.

Diskussion

zu dem Referat von M. ROTHE

RUDINGER: Boissonnas hat mit seinen Mitarbeitern gezeigt [Helv. Chim. Acta 38, 1491 (1955)] daß die Ausbeute an Aktivität bei dem Disulfid-Ringschluß mit Oxytocin die gleiche ist, wenn man in nicht verdünnter Lösung und sogar mit dreißigfachem Überschuß an Cystein arbeitet. Außerdem hat es sich bei der Arbeit mit Analogen gezeigt — und zwar der Schweizer Gruppe [Guttmann S., Jaquenoud P.-A., Boissonnas P. A., Konzett H., Berde B.; Naturwiss. 44, 632 (1957)] bei einem Peptid mit einem extra Tyrosin im Ring, und Ressler und du Vigneaud [J. Am. Chem. Soc. 79, 4511 (1957)] bei dem Isoglutaminderivat, das also um zwei Glieder im Ring mehr enthält — daß die Ringschlußbereitschaft anscheinend in diesem Fall nicht kritisch von der Ringgröße abhängt. Es scheint also, daß der Ringschluß hier nicht den konventionellen stereochemischen Begriffen aus der carbocyclischen Chemie entspricht. In dem Zusammenhang wäre es wohl interessant die Ausbeute in Abhängigkeit von der Verdünnung zu verfolgen — gibt es vielleicht solche Arbeiten?

ROTHE: Ja, das haben wir gemacht um überhaupt zuerst einmal zu den geeigneten Reaktionsbedingungen zu kommen, und wir haben gefunden, daß 0,001M Lösungen vollkommen ausreichen, um einen guten Ringschluß zu bekommen.

RUDINGER: War das bei Peptiden aus  $\alpha$ -Aminosäuren?

ROTHE: Nein, das war bei der  $\epsilon$ -Aminokapronsäure.

RUDINGER: Nach Schwyzer's Angaben scheint es auch — und das weiß man schließlich aus der Polypeptid- und Proteinchemie — als ob es bei den Peptiden gewisse konfigurative Bedingungen gäbe, die die Enden der Kette sozusagen selbst zusammenhalten.

ROTHE: Aber ich darf dazu sagen, daß wir Peptide von  $\alpha$ -Aminosäuren auch bei denselben Konzentrationen ohne weiteres cyclisieren können; wir haben also die Erfahrung mit den  $\epsilon$ -Aminosäurepeptiden auf die  $\alpha$ -Aminosäurepeptide übertragen.

RUDINGER: Ob das aber nicht auch bei weniger „optimalen“ Bedingungen gleich gut gehen kann?

ROTHE: Ja, es entsteht aber doch dann mehr Polykondensationsprodukt. Das haben wir allerdings nicht systematisch verfolgt.

WIELAND: In Zusammenhang mit den Oxytocin-peptiden wollte ich fragen, ob man bei dem oxydativen Ringschluß zu Disulfiden auch definierte Polysulfide bekommt?

ROTHE: Rydon [J. Chem. Soc. 1956, 3157] schreibt, daß sie nur in geringen Mengen entstehen, gibt aber keine genaue Ausbeuten an.

WIELAND: Es sieht doch tatsächlich so aus, als ob ein Polydisulfid von geeigneter Kettenlänge instabiler sei als das cyclische Disulfid. Es könnte also gut sein, daß in konzentrierter Lösung wohl solche Polysulfide entstehen, die aber — man kennt ja solche Umwandlungen von Disulfiden, „Umdisulfidierungen“ — in das stabile Endprodukt übergehen.

RUDINGER: Das wird wohl der Unterschied zwischen Disulfid-Ringschlüssen und denen durch irreversible Reaktionen sein, denn hier kann ja auch ein gemischtes Cystein-Oxytocin-Disulfid ruhig in das cyclische Disulfid übergehen.

WIELAND: Ja, und wenn bei Peptiden einmal so etwas passiert ist, ist endgültig Schluß, da gibt es eben keine Gleichgewichtseinstellung mehr. Übrigens kennt man ja solche Sachen bei dem Poly- $\epsilon$ -caprolactam auch — wenn man das Perlon erhitzt, bekommt man wieder das Monomere unter Cyclisierung.

Herr Dr. Rothe hat auch unser Verfahren der Dicyclohexylcarbodiimid-Cyclisierung erwähnt. Wir haben es natürlich auf andere Peptide zu übertragen versucht und haben in allen Fällen, wo nicht Glycin amino-endständig steht, nur sehr geringe Ausbeuten an Cycloprodukt erhalten. Wenn man die Tabelle von Herrn Rothe genauer ansieht, so sieht man, daß auch sehr viele Modellcyclisierungen immer mit Peptiden gemacht werden bei denen Glycin am Ende steht.

ROTHE: Alle Cyclisierungen außer beim Gramicidin S.

WIELAND: Da muß man dann doch darauf hinweisen, daß das Glycin eben diejenige Aminosäure ist, die am wenigsten sterisch gehindert ist. Die Aminogruppe des Glycins ist jeder Reaktion leichter zugänglich, also auch der intramolekularen Cyclisierungsreaktion.

## Cyclische Peptide

ROTHE: Um das zu prüfen, hatten wir das schon erwähnte Valinpeptid untersucht.

WIELAND: Ich glaube die Sache steht ungefähr so: wenn man ein Cyclopeptid zu machen hat, in dem Glycin überhaupt vorkommt, dann muß man das Glycin bis zum Schluß als amino-endständig aufbewahren und dann mit einer dieser Methoden cyclisieren.

RUDINGER: Man kann auch zu dem entgegengesetzten Schluß kommen. Wir wollten einmal versuchen Cyclohexapeptide aus Phenylalanin, Leucin und Glycin zu machen, wo das Phenylalanin in verschiedener Konfiguration wäre. Wir sind da zu dem Schluß gekommen, daß es vielleicht das weiseste wäre das Glycin an Carboxylende zu haben, um die optische Reinheit des Produktes nicht zu gefährden.

ROTHE: Man hat meistens zwei Glycinreste, einen am Anfang und einen am Ende! Bei dem Valinpeptid haben wir das doch anders gemacht als Prof. Wieland. Wir haben Valin an das Amino-ende gesetzt, und das geht also auch.

WIELAND: Mit welcher Ausbeute?

ROTHE: Sie haben für die Carbodiimidmethode mit amino-endständigem Glycin 45% angegeben, wir haben mit amino-endständigem Valin 39% erzielt.

WIELAND: Noch vielleicht ein Wort zu dem Boissonnas-Verfahren der Cyclisierung, also simultane Einwirkung von Äthylkohlenensäurechlorid auf ein Oligopeptid mit freier Aminogruppe. Wir haben auch auf diesem Gebiet einige Erfahrungen gesammelt, und uns scheint die Hauptschwierigkeit, mit der Boissonnas zu kämpfen hatte, die zu sein, daß sein Oligopeptid sehr schwer löslich war. Er mußte in Dimethylformamid arbeiten und es ist schon eine Frage, ob da überhaupt eine wahre Lösung eintritt. Ich glaube, daß diese Verfahren sehr grosse Aussicht auf Anwendbarkeit haben, wenn es gelingt, das Ausgangsmaterial echt und klar aufzulösen. Dazu haben wir, wie ich schon erwähnt habe, Trichloressigsäure verwendet. In Gegenwart von Trichloressigsäure lösen sich viele Peptide ganz gut in Tetrahydrofuran — man braucht gar nicht so konzentrierte Lösungen zu haben, man muß ja sowieso verdünnen; man kann natürlich konzentrierte Lösungen in Gegenwart von Trichloressigsäure herstellen und kann die dann verdünnen, dann ist man ganz sicher, daß man eine wirklich optisch klare Lösung bekommt. Dann läßt man Chlorkohlensäureester dazutropfen und gibt dann die Base zu; man braucht nicht zu erwärmen, sondern läßt einige zeitlang stehen. In den Versuchen, die wir durchgeführt haben, haben wir die Produkte leider nicht kristallisiert isolieren können; das liegt aber daran, daß es sehr kompliziert zusammengesetzte Cyclopeptide sind. In allen Kriterien, die man anstellen kann, haben sie sich aber als monomere Cyclopeptide erwiesen, und zwar war die Ausbeute recht gut.

ROTHE: Wie wurde das Molekulargewicht bestimmt?

WIELAND: Das Molekulargewicht ist kryoskopisch in dem Lactam der Hexyhydro-*p*-aminobenzoesäure bestimmt worden. Das Verfahren stammt von Wendt.

ROTHE: Wendt hat die Substanz als Lösungsmittel eingeführt; wir haben sie zuerst auf cyclische Peptide angewendet [Chem. Ber. 88, 284 (1955)].

WIELAND: Herr Rothe, Sie haben auch das Thiophenylester-Verfahren als erster benützt, in der  $\epsilon$ -Caprolactam-cyclisierungsschemie. Dieses Verfahren haben wir uns natürlich auch schon lange für diesen Zweck vorgenommen und es ist auch schon erwähnt worden, daß es gehen wird. Jetzt haben wir das tatsächlich nachgeholt — an einem Hexapeptid, dessen Thiophenylester man leicht bereiten kann, indem man nämlich das Hexapeptid aus dem Thiophenylester selbst aufbaut. Ich habe neulich in meinem Vortrag darauf hingewiesen, daß die Thiophenylester als Aminkomponenten bei Peptidsynthesen verwendet werden können, man braucht also nicht nachträglich die Thiophenylgruppe einzuführen, sondern man kann sie schon im Ausgangsmaterial haben. So ein Hexapeptid mit freier Thiophenylgruppe am Ende hat sich ganz glatt unter den von Schwyzer angegebenen Bedingungen — Pyridin und Dimethylformamid — beim Erhitzen cyclisiert. Die Ausbeute betrug 20% an rekristallisiertem Produkt.

ROTHE: Noch eine Sache, die ich in meinem Vortrag nicht gesagt hatte; viele cyclische Peptide besitzen Kristallwasser, das sich beim Trocknen sehr schlecht entfernen läßt, so daß man da an Einschlußverbindungen denken könnte. Das sind dann Molekulargewichtsbestimmungen schwierig, denn wenn z. B. die Molekulargewichtsbestimmung auf ein cyclisches Tripeptid hinweist, und es ist noch ein Molekül Kristallwasser dabei, so ist in Wirklichkeit ein Hexapeptid vorhanden. Das sind möglicherweise Fehler in der Literatur unterlaufen. Das ist besonders deshalb wichtig, weil bekanntlich bei Cyclisierungen von Tripeptiden unter Verdoppelung Cyclohexapeptide entstehen.



PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM ON METHODS  
OF PEPTIDE SYNTHESIS

Prague, September 1958

*Redaktor publikace J. Rudinger*

Vytiskl Knihtisk, n. p., závod 05, Praha 8

15,38 AA — 15,61 VA — 3022 — D-12 \* 01042

Náklad 900 výtisků — 03/6 — DT 547.96 — I. vydání

Cena šité brožury Kčs 18,30

56/III-3