

Peptidsynthesen II.¹⁾

9. Mitteilung *)

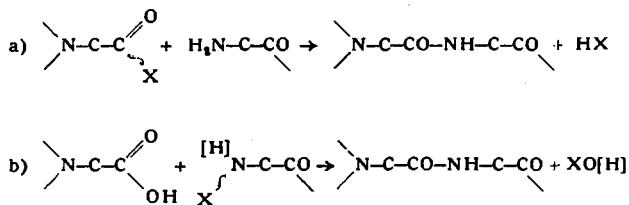
Von Prof. Dr. THEODOR WIELAND

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

Vor nahezu 4 Jahren ist in dieser Zeitschrift eine Zusammenfassung aller wichtigen methodischen und theoretischen Kenntnisse gegeben worden, die man in der 1. Hälfte dieses Jahrhunderts im präparativen und biologischen Bereich der Peptidchemie gesammelt hat. Die Erforschung dieses Gebiets ist seitdem mit unverminderter Schnelligkeit weitergegangen, so daß es gerechtfertigt scheint, die neuesten Ergebnisse jetzt wieder gesammelt darzustellen.

Einleitung

Wie im letzten Bericht¹⁾ geschildert wurde, hat man, den Anregungen *Emil Fischers* und *Theodor Curtius'* folgend, bei den allermeisten Synthesen bis damals versucht, die Knüpfung der Peptidbindung in einer Acylierungsreaktion, durch Verwendung eines Anhydrid-artigen Derivats der am Stickstoff geschützten Aminosäure (Amino-endständige Aminosäure, Kopfaminosäure) mit der freien Amino-Gruppe der anderen Aminosäure (Carboxyl-endständige Aminosäure, Endaminosäure) oder ihres Esters zu erreichen (Typ a). Dieser Reaktionstyp wurde auch in letzter Zeit wesentlich erweitert und verbessert. Gleichbedeutend wurde aber nun die andere prinzipielle Möglichkeit der Amid-Verknüpfung, nämlich die Reaktion der N-Acylaminosäure mit einem am Stickstoff aktivierten Derivat der 2ten Aminosäure (Typ b), deren Brauchbarkeit sich zur Zeit des vorangegangenen Berichts eben zu zeigen begann.

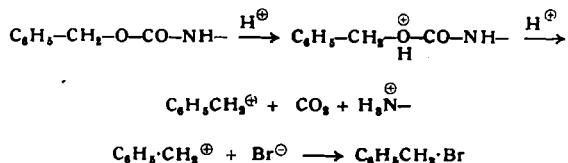


Beide Reaktionsarten sollen im folgenden kurz abgehandelt werden. Vorangestellt sei ein Überblick über neue zum reversiblen Schutz der Amino-Gruppe geeignete befundene Reste.

Leicht abspaltbare Acyl-Reste

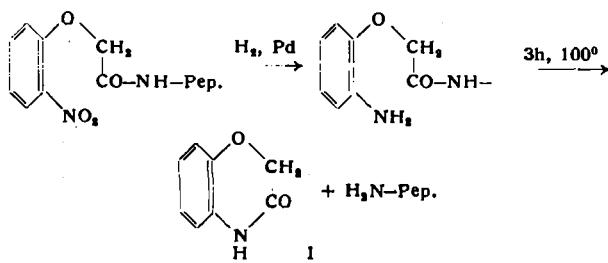
Der in so vielen Fällen bewährte Carbobenzoxyl-Rest (Cbo-), dessen Verwendung auf seine hydrogenolytische Abspaltbarkeit zurückgeht, hat sich nun auch noch anderweitig als wertvoll erwiesen. Es hat sich herausgestellt, daß seine leichte Ablösung durch HJ und P in Eisessig, welche *Harington* und *Mead*²⁾ als Erfolg einer Reduktion deuteten, in Wirklichkeit eine durch H-Ionen katalysierte Halogenwasserstoff-Solvolyse darstellt. Die Reaktion gelingt auch mit HJ ohne P³⁾ und ebenso mit HBr⁴⁾. *Albertson* und *McKay*⁵⁾ zeigten schließlich, daß Nitromethan als Lösungsmittel für die HBr-Reaktion be-

sonders geeignet ist und die Abspaltung in wenigen Minuten zu Ende geht. Sie formulieren:

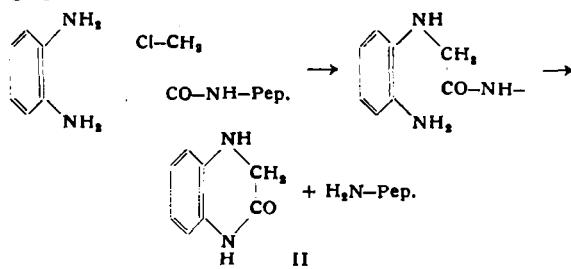


Als Nachteil der Cbo-Verbindungen wird ihre mitunter schwierige Kristallisierbarkeit empfunden. Deshalb hat man die ebenso leicht abspaltbaren, aber zu besser kristallisierenden Derivaten führenden p-Brom⁶⁾- und p-Nitro⁷⁾-Cbo-Reste als Verbesserungen vorgeschlagen.

Ein hier neues, beim stufenweisen Peptidabbau schon länger gebrauchtes Acyl-Spaltungsprinzip besteht in der Verwendung solcher Reste, die durch intramolekulare Acylierung eine energieärmere Ringverbindung auf Kosten der ursprünglichen Amid-Verbindung ausbilden. Von *Holley* und *Holley*⁸⁾ ist der o-Nitro-phenoxycetyl-Rest eingeführt worden, dessen Reduktion eine o-Amino-Verbindung ergibt, die dann bei 100 °C in Wasser die geschilderte Umlacylierung zum o-Amino-phenoxycessigsäure-lactam (I) unter Freilegung der geschützten NH₂-Gruppe durchmacht:



Weiterhin schlagen dieselben Autoren den Chioracetyl-Rest zur ganz ähnlichen Anwendung vor⁹⁾, da er bei 1 h Erhitzen mit o-Phenyldiamin über eine o-Aminophenylglycyl-Verbindung ebenfalls als Lactam (II) abgespalten wird:



*) 8. Mitteilung der Reihe „Über Peptidsynthesen“, vgl. Liebigs Ann. Chem. 583, 129 [1953].

¹⁾ Th. Wieland, Peptid-Synthesen I, diese Zeitschr. 63, 7 [1951]. Zweitlich über den Inhalt dieser Arbeit hinaus geht eine spätere Zusammenfassung von B. L. Shapiro, Chem. and Ind. 46, 1119 [1952].

²⁾ C. R. Harington u. T. H. Mead, Biochemical J. 29, 1604 [1938]. E. Waldschmidt-Leitz u. H. Kühn, Chem. Ber. 84, 381 [1951].

³⁾ G. W. Anderson, J. Blodinger u. A. D. Welcher, J. Amer. chem. Soc. 74, 5309 [1952]; D. Ben-Ishai u. A. Berger, J. org. Chemistry 17, 1564 [1952]; 19, 62 [1954]; R. A. Boissonnas u. G. Preitner Helv. Chim. Acta 36, 875 [1953]. R. Schwyzer, ebenda 37, 647 [1954].

⁴⁾ N. F. Albertson u. F. C. McKay, J. Amer. chem. Soc. 75, 5323 [1953].

⁵⁾ D. M. Channing, P. B. Turner u. G. T. Young, Nature [London] 167, 487 [1951].

⁶⁾ F. H. Carpenter u. D. T. Gish, J. Amer. chem. Soc. 74, 3818 [1952]; 75, 950 [1953].

⁷⁾ R. W. Holley u. A. D. Holley, J. Amer. chem. Soc. 74, 3069 [1952].

Der Trifluoracetyl-Rest, $\text{F}_3\text{C}-\text{CO}-$, läßt sich nach *Weygand*⁹⁾ durch 0,01–0,02 n Natronlauge bei Zimmertemperatur in 1 h vom N abspalten. Seine Einführung gelingt durch $\frac{1}{4}$ h Behandeln der feingepulverten Aminosäure mit 1 Mol Trifluoressigsäure-anhydrid (Trifluoressigsäure + Essigsäureanhydrid) bei 65 °C. Werden 2 Mole des Acylierungsreagenzes angewendet, so bilden sich gemischte Anhydride der Trifluoracetyl-aminosäure mit Trifluoressigsäure, die mit den Estern 2ter Aminosäuren Peptid-Derivate ergeben¹⁰⁾.

Gegen verdünnte Säure, schon Essigsäure labil ist hingegen der Triphenylmethyl-(Trityl)-Rest, dessen Kupplung an den Stickstoff von Aminosäureestern von *Heifrich*¹¹⁾ schon beschrieben wurde. Viele Tritylaminosäureester lassen sich unter Erhaltung dieses Schutzes alkalisch verseifen, die Tritylaminosäuren durch ganz vorsichtiges Ansäuern gewinnen, und, wenn auch nicht mit besonders gutem Erfolg, nach der Anhydrid-Methode (s. später) in Tritylpeptidester verwandeln¹²⁾. Auch der Benzal-Rest wird durch verdünnte Säure äußerst leicht vom Stickstoff abgespalten. Benzal-Verbindungen einiger Aminosäuren konnten wir durch Reaktion der Alkalosalze mit Benzaldehyd in Dimethylformamid kristallisiert gewinnen¹³⁾ und in orientierenden Versuchen der Peptidsynthese zugänglich machen.

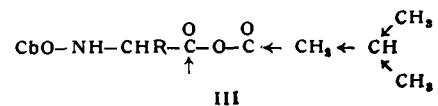
Als Modifikation der Abspaltung des Phthalyl-Rests durch Hydrazin sei schließlich noch die von *Boissonnas* vorgeschlagene¹⁴⁾ Aminolyse durch Phenylhydrazin beim Kochen mit einer tertiären Base in Alkohol erwähnt.

Peptidsynthesen unter Aktivierung der Carboxyl-Gruppe

1.) Anhydride mit Carboxyl-Verbindungen

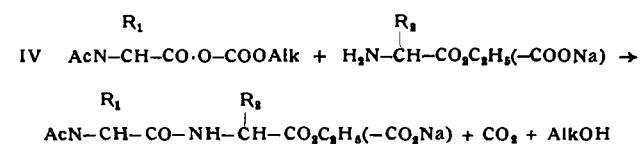
Die klassischen Peptidsynthesen (mit Chloriden und Aziden von Aminosäuren) sind in dieses Kapitel einzuröhren, wie im letzten Bericht¹⁾ ausführlich dargelegt wurde. Es war damals in unserem Laboratorium diesen gerade eine neue hinzugefügt worden. Sie bestand im Umsatz des tert. Aminsalzes einer acylierten Aminosäure mit Acetyl- oder Benzoylchlorid in einem inerten Lösungsmittel zum gemischten Anhydrid, das mit Estern 2ter Aminosäuren oder sogar mit deren Alkalosalzen in wäßriger Lösung unter Peptidverknüpfung reagierte¹⁵⁾. Hierbei tritt die Hilfssäure nicht oder nur in untergeordnetem Maß in die Amid-Bindung ein. Im nächsten Jahr zeigte sich die universelle Anwendbarkeit des neuen Syntheseprinzips in mehreren Arbeiten auch aus anderen Laboratorien. *Vaughan* und *Osato*¹⁶⁾ berichteten über ihre vergleichenden Versuche mit gemischten Anhydriden aus Cbo-Aminosäuren und 25 verschiedenen Carbonsäuren, die dann mit Estern 2ter Aminosäuren im wasserfreien Medium kondensiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Anhydride mit Isovaleriansäure besonders hohe Ausbeuten lieferten, da an der Isovaleryl-Hälfte des Anhydrids (III) mit ihrer relativ hohen Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff, unterstützt durch die sterische Hinderung,

der nucleophile Angriff des Amins weniger leicht einsetzt als an der Aminosäure-Hälfte (↑), wo er erwünscht ist¹⁷⁾.



Trifluoressigsäure als Anhydrid-Komponente führt nach demselben Prinzip ebenfalls zur Peptidsynthese¹⁰⁾.

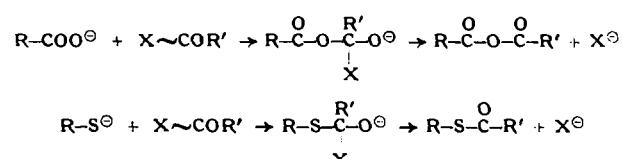
Hat man bei der Aufarbeitung solcher Ansätze die Hilfssäure immer zu entfernen, so entfällt diese Schwierigkeit bei der Verwendung von gemischten Anhydriden mit Alkylkohlensäuren, wohl der günstigsten Modifikation der „Anhydridmethode“, die etwa gleichzeitig von *Boissonnas*¹⁸⁾, *Vaughan*¹⁹⁾ und uns²⁰⁾ beschrieben wurde. Hierbei geschieht die Anhydrid-Bereitung, wie oben¹⁵⁾, aus dem tertären Aminsalz der N-Acylaminosäure mit einem Alkyl-kohlensäurechlorid um 0 °C im indifferenten Lösungsmittel. Die gemischten Anhydride (IV) werden dann entweder im selben Medium mit Estern 2ter Aminosäuren umgesetzt oder, was in unserem Laboratorium bevorzugt wird, mit der wäßrigen Lösung des Na-Salzes der 2ten Aminosäure intensiv gemischt. Die Peptidsynthese verläuft in beiden Fällen mit guter Ausbeute nach:



In Toluol oder Tetrahydrofuran tritt bei Cbo-Aminosäuren keine Racemisierung ein²¹⁾, partielle Racemisierung wurde aber dann beobachtet, wenn am N der acylierenden Aminosäure ein anderer Rest, z. B. auch der einer weiteren Aminosäure stand, wie in einem Cbo-Dipeptid²²⁾. Im allgemeinen liefern höhere Alkylester (tert. Butyl-, sec. Butyl-, n-Octyl-Kohlensäurechlorid), vielleicht aus den oben angeführten Gründen der Elektronenverteilung im Anhydrid etwas bessere Peptidausbeuten.

Diese Beobachtung ist auch von *Boissonnas* bei der stufenweisen Synthese des Gramicidin-ähnlichen Pentapeptids L-Valyl-L-(Cbo)-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin nach der Anhydrid-Methode gemacht worden²³⁾. Gewöhnlich wird man aber trotzdem den käuflichen Äthylester der Chlorkohlensäure benutzen. Methyl-, Benzyl- und Phenoylester sind hier nicht geeignet.

Die Acylierung der Carboxylations-(Anhydrid-Bildung) mit Hilfe eines energiereichen Säurederivats (Chlorids, Anhydriids usw.) verläuft sehr rasch und schon bei tiefer Temperatur. In ihrer Geschwindigkeit ist sie nur mit der Acylierung eines Mercaptid-Ions zu vergleichen. In beiden Fällen erfolgt der nucleophile Angriff auf den Acceptor, als ausgesprochene Ionenreaktion, fast momentan:



⁹⁾ F. Weygand u. E. Csendes, diese Ztschr. 64, 136 [1952].

¹⁰⁾ F. Weygand u. E. Leising, Chem. Ber. 87, 248 [1954].

¹¹⁾ B. Heifrich, L. Moog u. A. Jünger, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 883 [1925].

¹²⁾ A. Hillmann-Elies, G. Hillmann u. H. Jatzkewitz, Z. Naturforsch. 8b, 445 [1953]; H. Weidenmüller, Dipl.-Arbeit Frankfurt/M., 1953.

¹³⁾ G. Hörllein in Th. Wieland u. W. Schäfer, s. 43.

¹⁴⁾ I. Schumann u. R. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 35, 2235 [1952].

¹⁵⁾ Th. Wieland u. R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. 569, 117 [1950].

¹⁶⁾ J. R. Vaughan u. R. L. Osato, J. Amer. chem. Soc. 73, 5553 [1951].

¹⁷⁾ Vgl. dazu ähnliche Studien mit Hydroxylamin als nucleophilem Agens von Th. Wieland u. D. Stimmig, Liebigs Ann. Chem. 579, 97 [1952].

¹⁸⁾ R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 34, 874 [1951].

¹⁹⁾ J. R. Vaughan Jr. u. R. L. Osato, J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 [1951]; 74, 676 [1952].

²⁰⁾ Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 [1951].

²¹⁾ J. R. Vaughan Jr. u. R. L. Osato, J. Amer. chem. Soc. 74, 6137 [1952].

²²⁾ J. R. Vaughan Jr. u. A. A. Eichler, ebenda 75, 5556 [1953].

²³⁾ I. Schumann u. R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 35, 2237 [1952].

Um eine Größenordnung langsamer setzen sich Acylierungsreagenzien mit Aminen*) um, noch langsamer mit den noch weniger nucleophilen Alkoholen. Somit braucht eine Einwirkung des bei der modifizierten Anhydrid-Methode entstehenden Alkohols auf noch nicht in Reaktion getretenes Anhydrid nicht befürchtet zu werden, ist die Verwendung von Anhydriden als Acylierungsmittel in Wasser möglich. Der große Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten, wobei das Carboxylat-Ion weitaus vorne liegt, gestattete uns z. B. die Anhydridmethode für eine einfache Synthese des Pantethins (LBF) aus Pantothensäure und Cystamin heranzuziehen²⁴⁾, da sich das gemischte Anhydrid der Oxysäure ohne Angriff des Chlor-kohlensäureesters auf die —OH-Gruppe herstellen lässt. Auch β -Oxybuttersäure und Milchsäure sind aus demselben Grund der Anhydrid-Methode zugänglich²⁵⁾, ganz zu schweigen von Säuren ohne weitere funktionelle Gruppen wie Penicillin²⁶⁾ oder 3-Indolylessigsäure²⁷⁾ u. a.

Auch freie Amino-Gruppen sind aus dem erwähnten Grund bei der Anhydrid-Bildung aus dem Säure-Anion und Chlorkohlensäureester nicht besonders schädlich. Wie Boissonnas²⁸⁾ zeigen konnte, reagiert das Tributylammoniumsalz von Phthalylglycin, auch in Gegenwart von Glycinester, vorwiegend zum Anhydrid, und dieses reagiert erst bei 40 °C, nach Zugabe eines weiteren Mols Base im Sinn der Anhydrid-Synthese mit dem Glycinester zum Phthalyl-diglycinester weiter (58% Ausbeute). Bei Übertragung desselben Prinzips auf D-Leucylglycylglycin fand die Reaktion intramolekular statt und es resultierten 37% eines Ninhydrin-negativen cyclischen Tripeptids, dessen Hydrolyse die Bausteine Glycin/Leucin im Verhältnis 2 : 1 enthielt.

Bei dem Interesse, das man Cyclopeptiden entgegenbringt (s. Gramicidine, Phalloidin u. a.) hat man sich auch um andere Cyclopeptid-Synthesen bemüht. Erfolgreich waren z. B. die katalytische Hydrierung eines Cbo-Tripeptid-azids in stark verdünnter Lösung²⁹⁾ oder die Selbstkondensation von Tripeptidestern³⁰⁾; die besonders reaktionsfähigen Oligopeptid-thiophenylester sind in starker Verdünnung ebenfalls dieser Reaktion zugänglich. Ferner scheint von den Leuchsschen Körpern aus in Pyridin ein Weg zu cyclischen Produkten zu führen (s. später).

2.) Innere Anhydride

Die „Leuchsschen Körper“, innere N-Carbaminsäure-anhydride von α -Aminosäuren haben, als polykondensierbare Aminosäure-Einheiten, auch in den letzten Jahren nicht an Interesse verloren. Zusätzlich zu den im letzten Bericht geschilderten Darstellungsweisen wurde ihre Bereitung aus N-Carbalkoxy-aminosäuren mit PBr_3 in Äther beschrieben³¹⁾. Vor einiger Zeit begannen Waley und Watson³²⁾ die Polykondensation des Sarkosin-N-carbonsäure-anhydrids in Nitrobenzol mit niedermolekularem Polysarkosin-diäthylamid als Initiator kinetisch zu verfolgen und fanden in Bezug auf das Monomere zu Anfang

*) Die stark nucleophilen Substanzen Hydroxylamin oder Hydrazin und seine Derivate kommen in der Geschwindigkeit ihrer Acylierung den oben genannten gleich. Bildung von Hydroxamsäuren nach der Anhydridmethode s. Th. Wieland u. D. Stimming, Liebigs Ann. Chem. 579, 97 [1952]; Th. Wieland u. H. Fritz, Chem. Ber. 86, 1186 [1953].

²⁴⁾ Th. Wieland u. E. Bokelmann, Naturwiss. 38, 384 [1951].

²⁵⁾ Th. Wieland u. H. Köppe, Liebigs Ann. Chem. 581, 1 [1953].

²⁶⁾ D. A. Johnson, J. Amer. chem. Soc. 75, 3636 [1953].

²⁷⁾ Th. Wieland, W. Schäfer u. E. Bokelmann, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 [1951]; G. Hörllein, Dissert. Frankfurt/M. 1954.

²⁸⁾ R. A. Boissonnas u. I. Schumann, Helv. Chim. Acta 35, 2229 [1952].

²⁹⁾ M. Winitz u. J. S. Fruton, J. Amer. chem. Soc. 75, 3041 [1953].

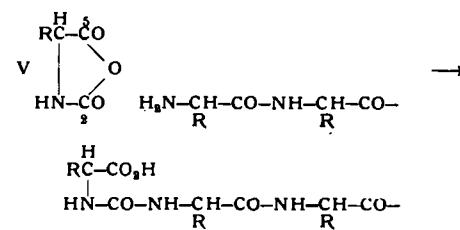
³⁰⁾ W. Brockmann, H. Tummes u. F. A. v. Metzsch, Naturwiss. 41, 37 [1954].

³¹⁾ D. Ben-Ishai u. E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. 74, 3688 [1952].

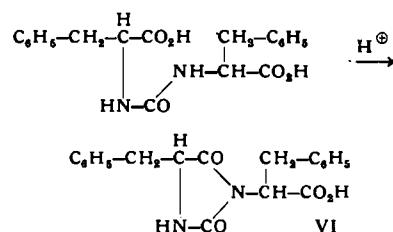
³²⁾ S. G. Waley u. J. Watson, Proc. Roy. Soc. 199, 499 [1949].

der Reaktion eine Ordnung < 1 , die sich erst im Laufe der Zeit der zu erwartenden 1ten annäherte. Der Grund für diese Unregelmäßigkeit besteht nach neueren Untersuchungen³³⁾ darin, daß der Vorgang durch CO_2 , das sich bekanntlich dabei entwickelt, stark katalysiert wird, was sich nur bei Druck-konstanter Messung exakt zeigt, in der vorher benützten Volum-konstanten Apparatur aber zu einer mit dem wachsenden CO_2 -Druck zunehmenden Geschwindigkeitskonstanten geführt hat. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen am Sarkosin, wo die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante einen negativen Temperatur-Koeffizienten hat, sind die analogen Reaktionen bei den N-Carbonsäure-anhydriden von Phenylalanin oder Leucin kinetisch anders und zeigen einen positiven Temperatur-Koeffizienten. Die thermische Polymerisation des Glycin-N-carbonsäure-anhydrids folgt nach Heyns³⁴⁾ demselben Gesetz wie die des Sarkosin-Derivats; das bei dieser Zersetzung entwickelte CO_2 entstammt, wie mit Hilfe von ^{13}C -Markierung gefunden wurde, dem N-gebundenen Carboxyl³⁵⁾.

Nucleophiler Angriff des Initiators auf C_5 des Oxazolidin-2,5-dions (V) scheint jedoch nicht die alleinige Reaktion zu sein. Neben ihr, die die fortschreitende Polymerisation weiterleitet, besteht auch die Möglichkeit der Beteiligung von C_2 , die zum Kettenabbruch unter Ausbildung einer Harnstoff-Struktur führt:



Sela und Berger³⁶⁾ isolierten nämlich nach Säurehydrolyse eines aus Phenylalanin-N-carbonanhydrid durch Erhitzen erzeugten Polymerisats wenig 5-Benzylhydantoin-3- β -phenylpropionsäure (VI) als Produkt der endständigen Harnstoff-Gruppierung³⁷⁾:



Über die Zersetzung der Leuchsschen Körper in absolutem Pyridin haben Wessely und Mitarb.³⁸⁾ neuerdings weitere Untersuchungen angestellt. Am Sarkosin-Derivat wurde versucht, das Polymere in seiner Struktur zu erkennen, wobei sich Anhaltspunkte für das Vorliegen eines Cyclopeptids vom Molgewicht von etwa 20000 ergaben (C, H-Analyse, Viscosität, Diffusionskonstante, Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol). Bei dieser Polymerisationsart treten Hydantoin und Diketopiperazine als Nebenprodukte auf, deren Entstehung uns unter Erweiterung der im letzten Bericht³⁴⁾ formulierten Zwitterionenhypothese erklärlich scheint.

³³⁾ D. G. Ballard u. C. H. Bamford, Nature [London] 172, 907 [1953].

³⁴⁾ K. Heyns u. R. Brockmann, Z. Naturforsch. 9b, 21 [1954].

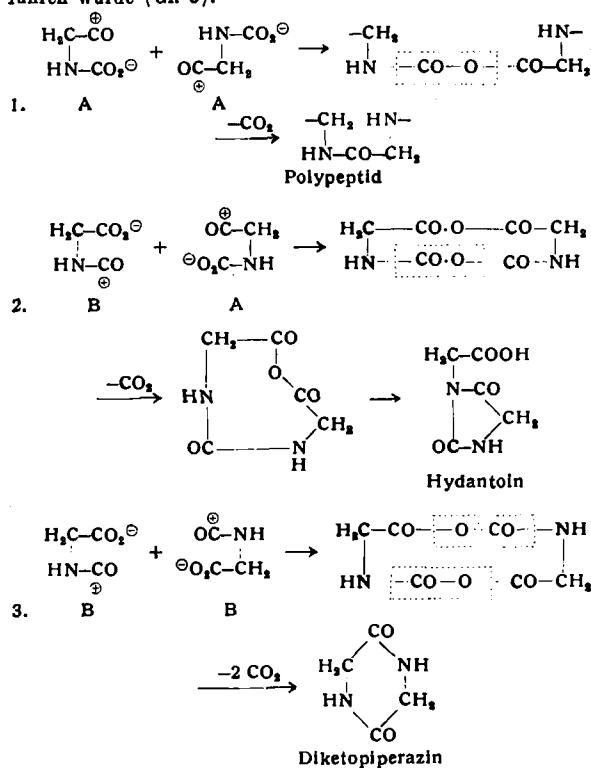
³⁵⁾ Vgl. A. Fry, J. Amer. chem. Soc. 75, 2686 [1953], der mit ^{14}C am ähnlichen Anhydrid $R-NH-CO-O-COR'$ dieselbe Beobachtung macht.

³⁶⁾ M. Sela u. A. Berger, J. Amer. chem. Soc. 75, 6350 [1953].

³⁷⁾ Vgl. F. Wessely, K. Schliegl u. G. Korger, Mh. Chemie 83, 1155 [1952].

³⁸⁾ L. Bilek, J. Derkosch, H. Michl u. F. Wessely, ebenda 84, 717 [1953].

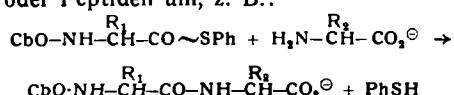
Neben dem (ohne die tert. Base formulierten) Zwitterion A, das durch Ionenpolymerisation über Carbamin-carbonsäure-anhydride zum Polypeptid reagiert (Gl. 1), könnte durch alternative Heterolyse ein Zwitterion B entstehen, dessen Reaktion mit A zum Hydantoin (Gl. 2) oder mit seinesgleichen zum Diketopiperazin führen würde (Gl. 3):



Unterwirft man α -Carboxy-hydroxamsäuren der Lossen-schen Reaktion, so resultieren α -Isocyanato-carbonsäuren, die, wohl über ein intermediäres Leuchssches Anhydrid, zu Polypeptiden zusammentreten³⁹). Auch Aminosäurechlorid-hydrochloride vermögen sich, z. B. in Dimethylformamid unter Zusatz einer tert. Base zu polymeren Polypeptiden zu vereinigen^{39a}). Eine lesenswerte Zusammenfassung über die bei den vorstehend beschriebenen Reaktionen entstehenden Poly- α -aminoäuren hat E. Katchalski⁴⁰) verfaßt.

3.) Aminoacyl-mercaptane

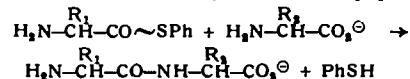
Die Carboxyl-Gruppe einer Aminosäure kann zum Zweck einer Peptidsynthese auch als Acylmercaptop (AcN-CHR-CO \sim S-R) aktiviert werden. In einem solchen ist der nucleophile Angriff des aufspaltenden Amins nur an einer Stelle möglich. Die Geschwindigkeit der Aminolyse wird von der Acidität des Mercaptan-Teils abhängen, da stark saure Thiole besonders leicht in den energiearmen Zustand des Anions überzugehen bestrebt sind. Zu diesen gehört z. B. Thiophenol (p_K um 7), dem ein großer Teil unserer Untersuchung gewidmet war. Die Thiophenylester N-acylierter Aminosäuren konnten unter Benützung der Anhydrid-Methode⁴¹), diejenigen der freien Amino-säuren aus den Chlorid-Hydrochloriden⁴²) mit Thiophenol gewonnen werden. Jene setzen sich in Alkohol oder Wasser in der Wärme mit Aminen und Aminosäure-Anionen zu Amiden oder Peptiden um, z. B.:



³⁹) Ch. D. Hurd u. Ch. M. Buess, J. Amer. chem. Soc. 73, 2409 [1951]. Dieselben u. L. Bauer, J. org. Chemistry 17, 865 [1952].
^{39a}) M. Frankel, Y. Litschitz u. A. Zilkha, J. Amer. chem. Soc. 76, 2814 [1954]; dieselben, Experientia 9, 179 [1953].
⁴⁰) E. Katchalski, Adv. Protein Chem. 6, 123 [1951].
⁴¹) Th. Wieland, W. Schäfer u. E. Bokelmann, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 [1951].
⁴²) Th. Wieland u. W. Schäfer, Liebigs Ann. Chem. 576, 104 [1952].

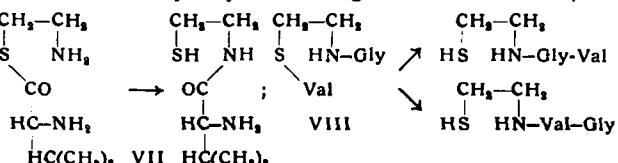
Nach Schwyzer⁴³) erleichtern Schwermetallionen (Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) die Aminolyse von Thioestern spezifisch. So entstehen aus S-Hippurylthioglykolsäure + Glycin bei p_H um 6 in Gegenwart der äquivalenten Menge AgNO_3 in 20 h bei 40 °C etwa 75% Hippurylglycin. Auch N-acylierte Aminothiosäuren wie Thiohippursäure $\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COSH}$, nach der Anhydrid-Methode aus Hippursäure und H_2S darstellbar, setzen sich mit 2ten Aminosäuren oder Estern unter H_2S -Abspaltung zu Peptiden um^{44, 45}).

Die freien Aminoacyl-thiophenole reagieren ebenfalls, besonders wenn sie auf einen Überschuß der Anionen einer 2ten Aminosäure treffen, zu freien Dipeptiden:

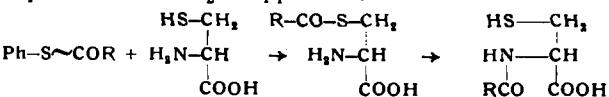


oder mit ihresgleichen in einer Polykondensation zu Oligopeptiden⁴⁶). Die analogen Dipeptid-thiophenylester erleiden sofortige Cyclisierung zu Diketopiperazinen. Aus den Tripeptidyl-thiophenolen ließen sich definiert aufgebaut Peptide mit 27–30 Bausteinen gewinnen⁴⁷). Zur Darstellung von S-Triglycyl-thioglykolsäure und ähnlichen Aminoacyl-mercaptopen kann man auch von den entsprechenden Cbo-Verbindungen ausgehen und den Cbo-Rest mit HBr in Eisessig ohne Zerstörung der CO-S-Bindung entfernen⁴⁸).

In der Annahme, daß S-Aminoacyl-Verbindungen bei der Biosynthese von Peptiden eine Rolle spielen könnten, sind auch solche von „biogenen“ Mercaptanen dargestellt worden. S-Valylcysteamin-HCl erleidet in Lösung schon bei p_H 5, fast momentan ab p_H 7 eine intramolekulare Umlagerung zum Valincysteamin (VII), was als Modellversuch für eine Peptidsynthese aufgefaßt werden darf⁴⁹):



Auch beim S-Valyl-N-glycyl-cysteamin (VIII) tritt in schwach alkalischer Lösung eine intramolekulare Reaktion zu einem Gemisch von Peptiden ein, deren Struktur auf eine primär ablaufende ähnliche Umlagerungsreaktion schließen läßt⁵⁰). Hiermit war gezeigt, daß auch S-Aminoacyl-Verbindungen aliphatischer Mercaptane als aktivierte Aminosäuren zu fungieren vermögen, ein Befund, der sich konsequent zu einer besonders glatt verlaufenden Synthese von Cysteinpeptiden ausbauen ließ. Die Aminoacyl-Verbindungen des Thiophenols übertragen ihren Acyl-Rest bereitwillig auf andere Mercaptane; darauf basiert eine allgemeine Reaktion zur Darstellung obiger aliphatischer S-Acyl-Verbindungen. Wird als aliphatisches Mercaptan Cystein mit einem Aminoacyl-thiophenol umgesetzt, so kommt es zu einer sehr raschen Übertragung des Aminoacyl-Rests auf den S des Cysteins. Infolge der idealen Nachbarschaft von S und NH_2 bleibt jedoch der energiereich gebundene Acyl-Rest nicht an seiner Stelle, sondern wandert mit großer Geschwindigkeit unter Bildung des Peptids auf die NH_2 -Gruppe über:



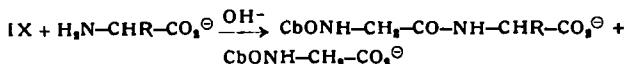
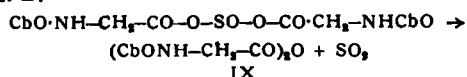
⁴³) R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta 37, 155 [1954].
⁴⁴) M. W. Cronyn u. J. Jiu, J. Amer. chem. Soc. 74, 7426 [1952].
⁴⁵) J. C. Sheehan u. D. A. Johnson, J. Amer. chem. Soc. 74, 7426 [1952].
⁴⁶) Th. Wieland u. W. Schäfer, diese Ztschr. 63, 146 [1951].
⁴⁷) Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 582, 218 [1953].
⁴⁸) R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta 37, 647 [1954].
⁴⁹) Th. Wieland u. E. Bokelmann, Liebigs Ann. Chem. 576, 20 [1952].
⁵⁰) Th. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang u. H. Lau, Liebigs Ann. Chem. 583, 129 [1953].

Diese zellmögliche Reaktion ist auch mit Cysteinylpeptiden ausführbar. In Anbetracht der Tatsache, daß S-Aminoacyl-Verbindungen des Glutathions von Leberextrakten gespalten werden^{60, 61}, halten wir derartige Reaktionen in der lebenden Zelle für durchaus möglich. Es sei hier erwähnt, daß auch Aminoacyl-Reste, die an ein N-Atom des Imidazols (Histidins) labil gebunden sind, mit Aminen und Aminosäureestern zu Amiden und Peptidestern reagieren⁶².

Acyliert man Thiophenol mit dem cyclischen Anhydrid der Cbo-glutaminsäure, so sind zwei Möglichkeiten der Aufspaltung gegeben, wobei je nachdem die α - oder γ -Thiophenyl-Verbindung der N-acylierten Glutaminsäuren entstehen. In Abhängigkeit von der Natur der zugesetzten tert. Base entsteht entweder die eine oder die andere als Hauptprodukt, mit Pyridin 70% α -, mit Triäthylamin 80% γ -Ester. Phthalyl-glutaminsäure-anhydrid ergibt immer die γ -Verbindung⁶³). Mit diesen neu gewonnenen Produkten lassen sich nach den oben erwähnten Methoden α - oder γ -Peptide der Glutaminsäure synthetisieren.

4.) Anhydride mit anorganischen Säuren

Außer den im letzten Bericht erwähnten Anhydriden N-acylierter Aminosäuren mit Derivaten der Phosphorsäure sind zum Zweck der Peptidsynthese einige wichtige weitere hinzugekommen. So konnten Kenner und Stedtman⁶⁴) aus Schwefeltrioxyd in Dimethylformamid und dem Na- oder Phenyl-trimethylammoniumsalz einer N-Acylaminosäure ein gemischtes Anhydrid $\text{AcNH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-\text{O}-\text{SO}_3-\text{Na}^+$ erhalten, das mit der wäßrig-alkalischen Lösung einer 2ten Aminosäure in 70proz. Ausbeute zum Dipeptid (unter teilweiser Racemisierung) reagierte. Sulfurylchlorid und Thionylchlorid als Reagenzien zur Bereitung von Doppelanhydriden, die ohne Isolierung weiter umgesetzt werden sollten, haben immer nur unter 50% an Peptiden geliefert⁶⁵). Wir haben u. a. darin einen Hinweis gesehen, daß sich solche labilen Gebilde leicht zu echten Anhydriden (IX) disproportionieren, bei deren Aminolyse bestenfalls die Hälfte ins Peptid verwandelt werden kann, z. B.



Dasselbe wurde mit Phosgen und Phenyl-phosphorsäuredichlorid beobachtet.

Größere Bedeutung haben die Derivate der phosphorigen Säure erlangt. Nach Anderson und Mitarb.⁶⁶) bilden sich aus Cbo-Aminosäuren und Diäthyl-phosphorigsäurechlorid, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PCl}$, oder o-Phenyl-chlorophosphit, $(\text{o})\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{PCl}$, oder Tetraäthyl-pyrophosphit⁶⁷), $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, unter den Bedingungen der oben genannten Anhydrid-Synthesen die entsprechenden gemischten Anhydride, die mit Aminosäureestern in der Kälte ohne Racemisierung in guter Ausbeute Peptide ergeben. Das homologe Diäthyl-chlor-arsenit, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{AsCl}$, eignet sich für dieselbe Reaktion in gleicher Weise⁶⁷), wobei sich die Aufarbeitung infolge der Wasserunlöslichkeit des As_2O_3

⁶¹) Th. Wieland u. H. Köppen, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

⁶²) Th. Wieland u. G. Schneider, ebenda 580, 159 [1953].

⁶³) H. L. Weidenmüller, Dissert. Frankfurt/M. 1954; vgl. Referat des Vortrags von Th. Wieland, Chimia 8, 72 [1954].

⁶⁴) G. W. Kenner u. R. J. Stedtman, J. Chem. Soc. [London] 1952, 2069.

⁶⁵) G. W. Anderson u. R. W. Young, J. Amer. chem. Soc. 74, 5307 [1952].

⁶⁶) G. W. Anderson, J. Blodinger u. A. D. Welcher, ebenda 74, 5309 [1952].

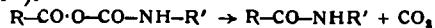
⁶⁷) J. R. Vaughan Jr., ebenda 73, 1389 [1951].

besonders einfach gestaltet. Eine zusätzliche Bedeutung der letztgenannten Derivate liegt in ihrer Verwendbarkeit zur Aktivierung der Amino-Gruppe, worüber im nächsten Abschnitt berichtet wird.

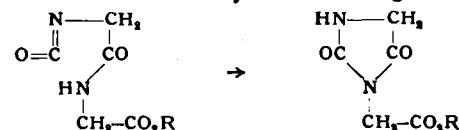
Peptidsynthesen unter Aktivierung der Amino-Gruppe

1.) Als Isocyanat

Die Reaktion von Carbonsäuren mit Isocyanaten führt zu gemischten Carbaminsäure-Carbonsäure-anhydriden, die sich in der Wärme unter CO_2 -Abspaltung zu Amiden zersetzen⁶⁸).



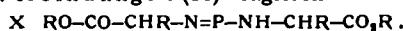
Goldschmidt und Wick⁶⁹) haben diese Reaktion erstmalig systematisch für Peptidsynthesen angewandt, indem sie α -Isocyanato-fettsäureester (aus Aminosäureestern und Phosgen in Toluol bei 120 °C erhältlich) mit N-Acylaminosäuren auf 110 °C bis zur Beendigung der CO_2 -Entwicklung erhitzten. Bei der alkalischen Verseifung des Esters ist ein Alkali-Überschuß zu vermeiden, da sonst Carbonyl-bisaminosäuren entstehen⁷⁰). Ein cyclisches Produkt bildete sich bei Versuch Diglycinester mit Phosgen in die Isocyanat-Verbindung zu verwandeln. Statt dessen entstand in quantitativer Reaktion Hydantoin-3-essigester nach



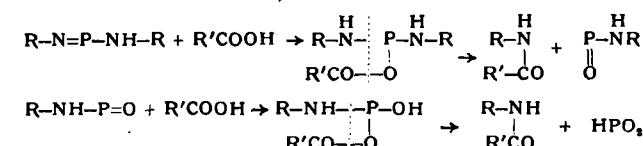
Mit Tripeptidestern sind bisher keine Versuche beschrieben worden.

2.) Als Phosphorigsäure-Amide

Zur Zeit der letzten Berichterstattung war dem Verfasser von O. Süs gerade mitgeteilt worden, daß eine Peptidsynthese aus N-Acylaminosäuren und Aminosäureestern auch in einfacher Weise durch Versetzen dieses Gemisches in Benzol-Dioxan mit Phosphortrichlorid gelänge. Dieses in mehreren weiteren Versuchen⁷¹) erhärtete Ergebnis hat seine theoretische Erklärung in einer nachfolgenden Arbeit von S. Goldschmidt⁷²) gefunden, wonach Aminosäureester mit PCl_3 besonders in Gegenwart tert. Basen zu Phosphoaza-Verbindungen (X) reagieren:



Diese setzen sich mit Cbo-Aminosäuren zu Cbo-Peptiden um, analog zu der von Grimmel und Mitarb.⁷³) beschriebenen Amid-Bildung aus Phosphoaza-Verbindungen der Amine mit Carbonsäuren, die man etwa so formulieren kann:



Verbindungen des Typs X, mit Cbo-Aminosäuren oder Cbo-Peptiden in Pyridin zur Reaktion gebracht, geben ohne Racemisierung über 80% an Cbo-Di-, Tri- und Tetrapeptidestern⁷⁴). Auch das schwierig aufzubauende Glutathion konnte so in mehreren Stufen mit 27% Gesamtausbeute synthetisiert werden⁷⁵).

⁶⁸) W. Dieckmann u. F. Breest, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 3052 [1906].

⁶⁹) S. Goldschmidt u. M. Wick, Z. Naturforsch. 5b, 170 [1950]; Liebigs Ann. Chem. 575, 217 [1952].

⁷⁰) F. Wessely u. E. Kann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 174, 306 [1928].

⁷¹) O. Süs, Liebigs Ann. Chem. 572, 96 [1951].

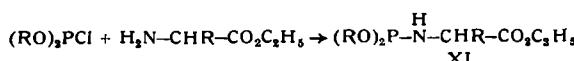
⁷²) S. Goldschmidt, diese Ztschr. 62, 538 [1950].

⁷³) H. W. Grimmel, A. Guenther u. J. F. Morgan, J. Amer. chem. Soc. 68, 539 [1946].

⁷⁴) S. Goldschmidt u. H. Lautenschlager, Liebigs Ann. Chem. 580, 68 [1953].

⁷⁵) S. Goldschmidt u. Ch. Jutz, Chem. Ber. 86, 1116 [1953].

Im Prinzip recht ähnlich ist die von *Anderson* und Mitarb.⁶⁶⁾ unabhängig entwickelte Methode zur Aktivierung der Amino-Gruppe von Aminosäureestern durch Reaktion mit Diäthyl-phosphorigsäurechlorid in Äther und Triäthylamin, wobei Phosphitamide (XI) entstehen:



Diese lassen sich wie die Phosphoaza-Verbindungen (X) durch Erwärmen mit Cbo- oder Phthalylaminosäuren, wohl unter primärer Addition der COOH-Gruppe an den ungesättigten Phosphor und nachfolgender Abspaltung von Dialkylphosphit zu Peptidestern, z. T. in vorzüglicher Ausbeute, umsetzen. Peptidester treten ebenfalls in Reaktion zu Tripeptid-Derivaten. Dieselben Autoren⁶⁶⁾ konnten schließlich die Methode durch Anwendung von Tetraäthyl-pyrophosphit noch erweitern. Dieses Anhydrid, das aus Diäthylphosphit + Diäthyl-chlorophosphit leicht erhältlich ist, reagiert, wie oben erwähnt, mit N-Acylaminosäuren unter Bildung eines gemischten Anhydrids, mit Aminosäureestern zu Phosphitamiden (XI). Läßt man es also auf ein Gemisch beider Komponenten 30 min in der Hitze einwirken, so findet so oder so Peptidsynthese statt, die auch auf höhere Oligopeptide anwendbar ist. Als gutes Lösungsmittel, auch für Derivate höherer Peptide, die an diesem Punkt oft Schwierigkeiten bereiten, dient Diäthylphosphit. Auch das schon erwähnte Dialkyl-arsenigsäurechlorid⁶⁷⁾ vermag Amino-Gruppen in derselben Weise zu aktivieren.

Als Musterbeispiel für die Anwendung der klassischen und der neu entwickelten Peptidsynthese-Methoden, deren Prinzipien hier erörtert sind, steht die vor kurzem von *du Vigneaud* und Mitarb.⁶⁷⁾ ausgeführte Synthese des Hypophysenhormons Ocytocin, eines durch eine Disulfid-Brücke cyclisierten Ennea-peptidamids⁶⁸⁾.

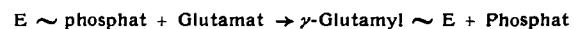
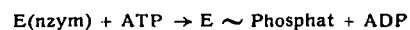
Biochemische Schlußbemerkung

Der an der Chemie des Organischen interessierte Naturwissenschaftler wird natürlich fragen, ob wir mit diesen präparativen Erkenntnissen dem Verständnis der biologischen Peptidsynthese näher gerückt sind, die heute zu den aktuellsten Themen dieser Wissenschaft gehört. Deshalb mögen hier nochmals diejenigen Tatsachen genannt werden, die, als Erkenntnisse der Reagenzglaschemie, unsere biochemischen Überlegungen zu beeinflussen, die biochemischen Resultate zu beleuchten geeignet sind. Mit diesen ist man allerdings über den Stand, wie er zur Zeit der letzten Zusammenfassung⁶⁹⁾ vorlag, nicht sehr weit hinausgekommen. Eine direkte Vereinigung von zwei freien α -Aminosäuren zu einem Dipeptid, die präparativ nicht ausführbar ist, hat sich auch unter Zuhilfenahme von Enzymen bisher als unmöglich erwiesen. Bei der bis heute als Paradebeispiel dastehenden zellfrei-enzymatischen Synthese des Glutathions bedient sich die Natur bei der Knüpfung der α -Peptidbindung des vorhergehenden Schutzes der Amino-Gruppe des Cysteins durch den γ -Glutamyl-Rest, und erst die N-Acylaminosäure γ -Glutamylcystein vermag sich dann (in Gegenwart von Adenosintriphosphat und eines Proteins) mit Glycin, jedoch mit keiner anderen Aminosäure, zum Peptid zu vereinigen. *H. Waelisch*⁷⁰⁾ hat

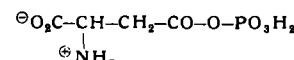
⁶⁶⁾ *G. W. Anderson, J. Blodinger, R. W. Young u. D. Welch*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 5304 [1952].
⁶⁷⁾ *V. du Vigneaud, Ch. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis u. S. Gordon*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 4880 [1953].
⁶⁸⁾ Vgl. diese *Ztschr.* 66, 62 [1954].
⁶⁹⁾ Vgl. Fußnote¹⁾; eine komplette Übersicht neuerer Datums gab *H. Borsook*, *Adv. Protein. Chem.* 8, 127 [1953].
⁷⁰⁾ *Phosphorus Metabolism* 2, 123 [1952].

auf diese mögliche Rolle des γ -Glutamyl-Rests als biologische Schutzgruppe hingewiesen, wobei er auch die nachträgliche Abspaltung, etwa durch spezifische Hydrolyse oder γ -Glutamyl-Übertragung auf andere Aminosäuren (γ -Glutamyl-transpeptidase⁷¹⁾) im Auge hatte.

Der enzymatische Aktivierungsvorgang der γ -Carboxyl-Gruppe, die an der Zwitterionenstruktur nicht beteiligt ist, läßt sich leicht verstehen und ist bei der Glutamin-Bildung vor kurzem aufgeklärt worden⁷²⁾. Hierbei nimmt das Enzym, eine hochgereinigte Glutaminsynthetase (γ -Glutamotransferase) pflanzlicher Herkunft bei der Reaktion mit Adenosintriphosphat (radioaktiv indiziert) eine Phosphat-Gruppe in energiereiche Bindung auf, es entsteht eines der früher vermuteten^{1, 60)} Zwischenprodukte, ein Enzym- \sim -phosphat, das sich mit Glutamat unter Acyl-Austausch zum γ -Glutamyl-Enzym umsetzt. Seine enzymatische Reaktion mit NH_3 ergibt schließlich aus L-Glutamat L-Glutamin, aus D-Glutamat langsamer den Antipoden⁷³⁾, mit Hydroxylamin in beiden Fällen rasch γ -Glutamyl-hydroxamsäure, wohl in nichtenzymatischer Reaktion.



Phosphorylierung des Enzyms ist auch bei der Reaktion von Glutaminsäure + Cystein der einleitende Schritt⁷²⁾. Das γ -Glutamyl-Enzym müßte nach unserem präparativen Erfahrungen, wonach Cystein über seine SH-Gruppe besonders leicht acylierbar ist (s. S. 510) gerade mit dieser Aminosäure schon ohne die Anwesenheit eines 2ten Enzyms zu γ -Glutamyl-cystein reagieren. In seiner Ladungsverteilung liegt dann in diesem „Dipeptid“ eine ähnliche Moleköl wie die der Glutaminsäure vor, d. h. die endständige Carboxyl-Gruppe muß sich ebenfalls, etwa nach obigem Muster, leicht aktivieren lassen, wobei auch eine Phosphorylierung des Enzyms voraus geht⁷⁴⁾. Als Zwischenprodukt der ähnlichen Aktivierung von Asparaginsäure soll dagegen freies Aspartylphosphat als energiereiches Anhydrid auftreten⁷⁵⁾.



Beide Acyl-Reste können also wohl als zelleigene Schutzgruppen für α -Aminosäuren vor der eigentlichen Peptidsynthese eine Rolle spielen. Daß die sauren Aminosäuren in den allerersten Produkten der peptidartigen Vereinigung der Aminosäuren in wachsender Hefe in besonders hoher Konzentration enthalten sind, hat vor kurzem *F. Turba*⁷⁶⁾ tatsächlich mit Hilfe der Papierelektrophorese nach radioaktiver Markierung deutlich zeigen können. Ob allerdings ihre Fixierung nach dem obigen Schema verläuft und ob solche γ -Glutamyl- oder β -Aspartyl-peptide einer weiteren Kettenverlängerung nach demselben Muster zugänglich sind, ob dem Glutathion hierbei eine zentrale Bedeutung zukommt⁷⁷⁾ oder ob die Zelle weitere, bisher noch ungeklärte Methoden besitzt, Amino-Gruppen reversibel zu schützen und außer Wirkung zu setzen oder zu aktivieren, das sind einige heute im Vordergrund stehende Fragen.

Eingeg. am 19. Mai 1954 [A 590]

⁷¹⁾ *C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood*, *Biochemic. J.* 51, 25 [1952].
⁷²⁾ *G. C. Webster u. J. E. Varner*, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 633 [1954].
⁷³⁾ *L. Levinton u. A. Meister*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 3039 [1953].
⁷⁴⁾ *J. E. Snoke*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 4872 [1953].
⁷⁵⁾ *S. Black u. N. M. Gray*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 2271 [1953].
⁷⁶⁾ *F. Turba u. H. Esser*, diese *Ztschr.* 65, 256 [1953].
⁷⁷⁾ Vgl. Referat *Th. Wieland*, ebenda 66, 34 [1954].