

VON PROF. DR. TH. WIELAND UND DR. H. DETERMANN  
INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT FRANKFURT/MAIN

Herrn Dr. W. Foerst in alter Freundschaft zum 65. Geburtstag

*In der Reihe der zusammenfassenden Darstellungen über die Fortschritte auf dem Gebiet der Peptidsynthese wird im folgenden ein Überblick über die Literatur von Anfang 1959 bis Mitte 1962 gegeben [\*].*

Einleitung	Verwendung von ungesättigten Verbindungen
Schutzgruppen	Verwendung von aktivierten Estern
Schützende Reste am Stickstoff	Verwendung von Phosphorderivaten
Schützende Reste an der Carboxylgruppe	Verwendung von Azolen
Methoden zur Kupplung	Sonstige Methoden
Verwendung von Chloriden	Synthese cyclischer Peptide
Verwendung von Hydraziden und Aziden	Racemisierung bei der Peptidverknüpfung

## Einleitung

Zur Zeit des letzten zusammenfassenden Berichtes über Peptidsynthesen [1] war die Chemie der Polypeptidhormone erschlossen worden. Um längere Ketten mit mehrfunktionellen Aminosäuren aufbauen zu können, hat man in den letzten Jahren versucht, neue spezifisch abspaltbare Schutzgruppen zu finden, die Ausbeuten bei den Kupplungsreaktionen zu steigern und die Racemisierung der natürlichen Aminosäuren zu vermeiden. Diese Bestrebungen haben zum Beispiel zur Synthese von corticotropin-wirksamen Peptiden mit der Sequenz der 23 [2] und 24 [3] ersten Aminosäuren des Naturstoffs geführt. Den früher [1] zitierten Zusammenfassungen über die mit der Synthese von Peptiden zusammenhängenden Probleme haben sich inzwischen weitere hinzugesellt [4–6].

## Schutzgruppen

### Schützende Reste am Stickstoff

Die hier besprochenen Reste lassen sich nicht nur zum Schutz des Stickstoffs, sondern auch von Hydroxyl- und Mercaptogruppen, meist unter Anwendung prinzipiell gleichartiger Methoden, benutzen [7].

[\*] Zugleich 28. Mitteilung in der Reihe „Über Peptidsynthesen“. – 27. Mitteilung: Th. Wieland, H. Determann u. W. Kahle, Angew. Chem. 75, 209 (1963). – Peptidsynthesen IV: Th. Wieland, Angew. Chem. 71, 417 (1959).

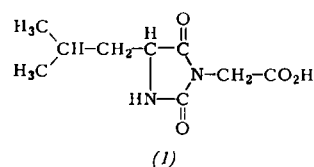
[1] Th. Wieland, Angew. Chemie 63, 7 (1951); *ibid.* 66, 507 (1954); Th. Wieland u. B. Heinke, *ibid.* 69, 362 (1957); Th. Wieland, *ibid.* 71, 417 (1959).

[2] K. Hofmann, H. Yajima, N. Yanaiharu, T. Y. Liu u. S. Lande, J. Amer. chem. Soc. 83, 487 (1961).

[3] H. Kappeler u. R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 44, 1136 (1961).

[4] J. P. Greenstein u. M. Winitz: Chemistry of the Amino Acids. Wiley, New York 1961.

Die Carbobenzoxygruppe, die wohl immer noch am meisten verwendet wird, führt bei der alkalischen Verseifung von Dipeptid-Estern mehr oder weniger leicht zur Bildung von Harnstoffderivaten [8]. Mit dieser störenden Reaktion hat sich in letzter Zeit MacLaren [9] eingehender befaßt. Er fand, daß Carbobenzoxydipeptidester, bei denen die Estergruppe am Glycin steht, schon in der Kälte umgelagert werden, wenn die Lauge im Überschuß angewendet wird. Zum Beispiel läßt sich Carbobenzoxy-glycyl-leucin-äthylester mit 2 Mol Lauge ohne Störung zum Carbobenzoxy-Dipeptid verseifen, während Carbobenzoxy-leucyl-glycinäthylester unter den gleichen Bedingungen das schwer lösliche Hydantinderivat (1) ergibt.



Nach Birkofer und Mitarbeitern [10] läßt sich der Carbobenzoxyrest auch durch die hydrierende Wirkung des Triäthylsilans [11] in Gegenwart katalytischer Mengen PdCl<sub>2</sub> und Triäthylamin abspalten, indem man die Carbobenzoxyderivate in diesem Lösungsmittel einige

[5] E. Bricas, Bull. Soc. chim. France 1961, 2001.

[6] N. F. Albertson, Org. Reactions 12, 157 (1962).

[7] Vgl. H. C. Beyerman u. J. S. Bontekoe, Proc. chem. Soc. (London) 1961, 249.

[8] F. Wessely u. E. Komm, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 174, 306 (1928); F. Wessely, K. Schlögel u. G. Korger, Nature (London) 169, 708 (1952); F. Wessely, K. Schlögel u. E. Wawersich, Mh. Chem. 83, 1426 (1952).

[9] J. A. MacLaren, Austral. J. Chem. 11, 360 (1958).

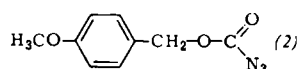
[10] L. Birkofer, E. Bierwirth u. A. Ritter, Chem. Ber. 94, 821 (1961).

[11] J. W. Jenkins u. H. W. Post, J. org. Chemistry 15, 556 (1950).

Stunden unter Rückfluß erhitzt und danach die entstandenen Silylderivate durch Methanol zu den freien Aminosäuren oder Peptiden zersetzt. Unter den gleichen Bedingungen lassen sich auch Benzylester hydrogenolytisch spalten, während die Benzylgruppierung am Schwefel erhalten bleibt.

Substituierte Carbobenzoxyreste erfreuen sich wegen der Möglichkeit abgestufter Reaktivität zunehmender Beliebtheit. Die Nitrogruppe im p-Nitrobenzyl-oxycarbonyl-Rest (PNZ-Rest) vermindert die Elektronendichte am Benzylkohlenstoff und erschwert somit die Abspaltung des Restes durch Bromwasserstoff in Eisessig. Hingegen wird der PNZ-Rest durch katalytisch erregten Wasserstoff viel leichter als die Carbobenzoxygruppe entfernt [12]. Diese Unterschiede ermöglichten die Darstellung von Prolyl-N(ε)-PNZ-lysin aus der Carbobenzoxy-Verbindung [13].

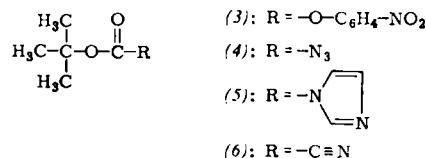
Der Effekt einer Methoxygruppe ist entgegengesetzt; er erleichtert die protonen-katalysierte Abspaltung des p-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-Restes (PMZ-Restes) bedeutend [14]. Seine Einführung gelingt nach Weygand und Hunger [15] über das kristallisierte Azid (2), die Abspaltung mit wasserfreier Trifluoressigsäure schon



bei 0°C. Der Carbobenzoxyrest wird unter diesen Bedingungen nicht entfernt, sondern erst bei 30 Minuten langem Kochen mit Trifluoressigsäure [16]. Zum Abfangen des Benzylkations, das Nebenreaktionen verursacht, muß ein Phenol zugesetzt werden. Über die Verwendung des 4-Chlorbenzyl-oxycarbonyl-Restes siehe [17].

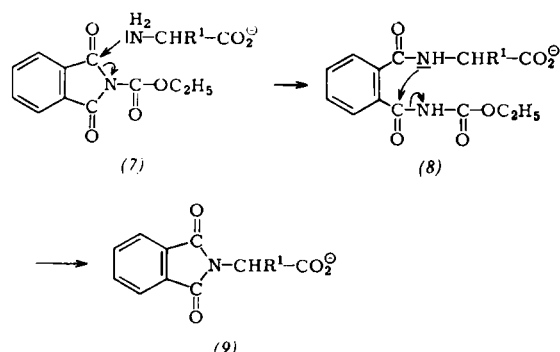
Zunehmende Bedeutung erlangt der tert.-Butyloxy-carbonyl-Rest (BOC-Rest) der zur Zeit der letzten Zusammenfassung [1] nur durch Reaktion der Isocyanatverbindungen mit tert.-Butanol eingeführt werden konnte. Mittlerweile sind mehrere elegantere Wege angegeben worden. Zunächst wurde die Darstellung von tert.-Butyl-p-nitrophenylcarbonat (3) beschrieben, das in Gegenwart von Laugen in 20 Minuten bei 100°C mit Aminosäuren reagiert [18]. Unter milderer Bedingungen kann man die Acylierung mit dem von Carpino [19] erstmalig dargestellten tert.-Butoxycarbonylazid (4) ausführen [20]. Auch das Imidazolid (5) [21] und das

Cyanid (6) [22] können zur einfachen Herstellung der BOC-Derivate verwendet werden.



Der BOC-Rest kann bei Zimmertemperatur nach Anderson und McGregor [18] mit Bromwasserstoff in Diäthylphosphit oder Eisessig sowie nach Schwyzer [23] – getrennt von der Carbobenzoxygruppe – mit wasserfreier Trifluoressigsäure abgespalten werden. Durch Essigsäure wird der Rest nicht entfernt, so daß es möglich ist, einen gleichzeitig vorhandenen Tritylrest gesondert abzuspalten [24].

Der Phthalylrest wird wegen seiner Alkaliempfindlichkeit, die neuerdings quantitativ gemessen wurde [25], immer weniger verwendet. Außerdem ist die heute übliche Abspaltung mit überschüssigem Hydrazinhydrat in alkoholischer Lösung bei basen-empfindlichen Peptiden nicht anwendbar. Daher ist die Beobachtung von Schwyzer und Mitarbeitern [26] wertvoll, wonach Hydrazin bereits in schwach saurer Lösung wirkt. Nach eigenen Beobachtungen kann der Phthalylrest auch durch Erhitzen mit Imidazol und wenig Wasser recht leicht entfernt werden. Seine Einführung gelingt heute nach Nefkens [27] mit Hilfe des N-Äthoxycarbonylphthalimids (7) innerhalb 15 Minuten bei Zimmertemperatur. Hierbei reagiert das Triacylamid (7) unter Ringöffnung zu einem Diacylamid (8), das unter Urethanabspaltung die



Phthalylaminosäure (9) ergibt. Auch durch Erhitzen mit Phthalsäurediphenylester ist die Phthalylisierung von Aminosäuren möglich [28]. In analoger Weise kann man den Trifluoressigsäure-Rest (TFA-Rest) einführen [29].

[12] C. Berse, R. Boucher u. L. Piché, J. org. Chemistry 22, 805, (1957).

[13] J. E. Shields u. F. H. Carpenter, J. Amer. chem. Soc. 83, 3066 (1961).

[14] F. C. McKay u. N. F. Albertson, J. Amer. chem. Soc. 79, 4686 (1957).

[15] F. Weygand u. K. Hunger, Chem. Ber. 95, 1 (1962).

[16] F. Weygand u. W. Steglich, Z. Naturforsch. 14b, 472 (1959).

[17] L. Kisfaludy u. S. Dualszky, Acta chim. Acad. Sci. hung. 24, 301 (1960); ibid. 24, 309 (1960); Chem. Abstr. 55, 9295 (1961).

[18] G. W. Anderson u. A. C. McGregor, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 (1957).

[19] L. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. 79, 98, 4427 (1957); L. A. Carpino, C. A. Giza u. B. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. 81, 955 (1959); vgl. auch [20].

[20] R. Schwyzer, P. Sieber u. H. Kappeler, Helv. chim. Acta 42, 2622 (1959).

[21] W. Klee u. M. Brenner, Helv. chim. Acta 44, 2151 (1961).

[22] L. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. 82, 2725 (1960).

[23] R. Schwyzer, W. Rittel, H. Kappeler u. B. Iselin, Angew. Chem. 72, 915 (1960).

[24] R. Schwyzer u. W. Rittel, Helv. chim. Acta 44, 159 (1961).

[25] J. Rudinger, J. Krupička, M. Zaoral u. V. Cernick, Collect. czechoslov. chem. Commun. 25, 3338 (1960).

[26] R. Schwyzer, A. Costopanagiotis u. P. Sieber, Chimia 16, 295 (1962).

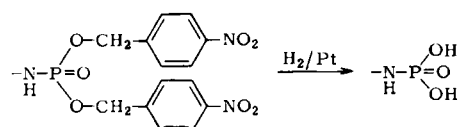
[27] G. H. L. Nefkens, Nature (London) 185, 309 (1960); G. H. L. Nefkens, G. J. Tesser u. R. J. Nivard, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 79, 688 (1961).

[28] F. Weygand u. J. Kaelicke, Chem. Ber. 95, 1031 (1962).

[29] F. Weygand u. A. Röpsch, Chem. Ber. 92, 2095 (1959).

N-Formylaminosäuren sollen bei Peptidsynthesen besonders leicht zur Racemisierung führen [30]. Trotzdem verdient eine Vorschrift Beachtung, nach welcher die Formylgruppe spezifisch durch Oxydation mit 15 proz. wäßrigem Wasserstoffperoxyd in 2 Stunden bei 60 °C entfernt wird [31]. Durch Oxydation mit Peroxybenzoesäure gelingt eine schonende Abspaltung des Äthylmercaptoformyl-Restes  $C_2H_5-S-CO-$ . Auf diese Weise wurde kürzlich eine größere Anzahl von Aminosäure- und Peptidderivaten hergestellt [32].

In p-Stellung substituierte Dibenzylphosphorsäurechloride, vorzugsweise die p-Nitroverbindung, gestatten die Einführung einer Phosphorester-Gruppierung, die sich durch katalytische Hydrierung vom Stickstoff abspalten läßt. Dabei entstehen intermediär die N-Phosphorylderivate, die äußerst säurelabil sind [33].



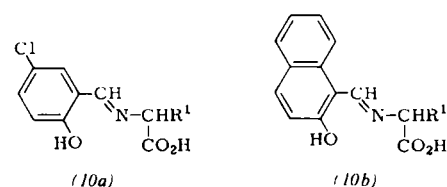
Das Verhalten der Benzylderivate ist weiter untersucht worden [34]. Man kann aus Dibenzylaminosäurebenzylestern oder Peptidbenzylestern alle Benzylreste durch siebentägige Behandlung mit bromwasserstoff-gesättigtem Eisessig abspalten. Der Cyanäthylrest  $NC-CH_2-CH_2-$ , der durch Anlagerung von Aminosäuren an Acrylnitril entsteht [35], wird beim Erhitzen auf Anilin oder andere Amine übertragen [36].

Interessant ist die neuerdings von Turba und Mitarbeitern [37] ausgearbeitete Vorschrift zur hydrogenolytischen Freisetzung von Aminen und Peptiden aus ihren 2,4-Dinitrophenyl-Derivaten. Es werden große Mengen eines Platin-Katalysators angewendet: aus dem Dinitrophenylrest entsteht m-Phenylendiamin.

Die o-Nitrophenylsulfonylgruppe  $o-O_2N-C_6H_4-S-$ , die durch schwache Säuren vom Stickstoff leicht abgespalten wird, läßt sich durch Reaktion der Natriumsalze oder Ester von Aminosäuren mit Sulfonylchloriden einführen [38].

Während die Benzylidengruppe als schützender Rest bei Peptidsynthesen nur in Vorversuchen angewendet wurde [39] und wegen ihrer extremen Säurelabilität keine

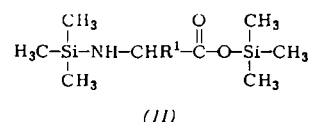
großen Hoffnungen aufkommen ließ, werden die von McIntire [40] synthetisierten stabileren o-Hydroxyarylidendenverbindungen (10a) und (10b) (Wasserstoff-



brücke!) neuerdings verwendet [41]. Aus den beständigeren Naphthylidenaminosäuren (Typ 10b) konnten mit Dicyclohexylcarbodiimid in guten Ausbeuten Peptide dargestellt werden, deren Schutzgruppen durch verdünnte Mineralsäure abgespalten werden.

Die Umsetzungsprodukte von  $\beta$ -Dicarbonyl-Verbindungen (wie Acetessigester, Benzoylacetone, Acetylacetone) mit Aminosäuren sind so beständig, daß sie zu Peptidsynthesen verwendet werden können. Die Abspaltung des durch Wasserstoffbrücken stabilisierten Schutzrestes (Schiffsche Base) gelingt ebenfalls durch gelinde Einwirkung von Säure [41a].

Ein neuerdings näher untersuchter Substituent ist der Trimethylsilylrest. N-Trimethylsilylaminosäureester erhält man aus Trimethylchlorsilan und Aminosäureestern [42]. Mit Salzen der Aminosäuren gibt das Chlorid Trimethylsilylaminosäure-trimethylsilylester (11) [43], die sich auch aus den Na-Salzen [44] oder den



Hydrochloriden [45] mit Trimethylsilyldiäthylamin bilden, wobei Diäthylamin entweicht. Besonders einfach bilden sich diese Ester aus freien Aminosäuren beim Erwärmen in Hexamethylsilazan  $[(CH_3)_3Si-NH-Si(CH_3)_3]$  unter Ammoniakentwicklung [46]. Die Trimethylsilylaminosäure-silylester lassen sich nach der Phosphoroxychlorid-Methode [47] oder über Carbonyldiimidazol [48] mit Carbobenzoxy-aminosäuren am Stickstoff acylieren, wobei die Silylgruppe nicht stört. Bei der Aufarbeitung erhält man infolge der extremen Wasserempfindlichkeit direkt das Carbobenzoxy-peptid [49].

[30] J. C. Sheehan u. D. H. Yang, J. Amer. chem. Soc. 80, 1154 (1958).

[31] G. Losse u. W. Zönnchen, Angew. Chem. 72, 385 (1960); Liebigs Ann. Chem. 636, 140 (1960).

[32] A. Hajós, Chem. Ber. 94, 2350 (1961).

[33] A. Cosmatos, J. Photaki u. L. Zervas, Chem. Ber. 94, 2644 (1961).

[34] K. T. Poroshin u. V. I. Maksimov, Nachr. Akad. Wiss. USSR, Abt. chem. Wiss. 1960, 1702; Chem. Abstr. 55, 9292 (1961); V. I. Maksimov u. K. T. Poroshin, ibid. 1961, 186; Chem. Abstr. 55, 20984 (1961).

[35] H. A. Bruson, Org. Reactions 5, 79 (1949).

[36] P. F. Butskus u. G. I. Denis, J. allg. Chem. (russ.) 30, 1317 (1960); Chem. Abstr. 55, 405 (1961); vgl. auch Chem. Abstr. 55, 1460 (1961) und 55, 24583 (1961).

[37] H. Fasold, G. Steinkopf u. F. Turba, Biochem. Z. 335, 1 (1961).

[38] J. Goerdeler u. A. Holst, Angew. Chem. 71, 775 (1959).

[39] Th. Wieland u. W. Schäfer, Liebigs Ann. Chem. 576, 104 (1952).

[40] F. C. McIntire, J. Amer. chem. Soc. 69, 1377 (1947).

[41] J. C. Sheehan u. V. J. Grenda, J. Amer. chem. Soc. 84, 2417 (1962).

[41a] DBP-Anmeldung (27. April 1961), Farbenfabr. Bayer A.G., Erf.: E. Dane, F. Drees u. P. Konrad.

[42] L. Birkofer u. A. Ritter, Angew. Chem. 68, 461 (1956); Liebigs Ann. Chem. 612, 22 (1958).

[43] K. Rühlmann, J. prakt. Chem. 281, 86 (1959).

[44] K. Rühlmann, J. prakt. Chem. 281, 315 (1959).

[45] K. Rühlmann u. G. Michael, Z. Naturforsch. 15b, 811 (1960); K. Rühlmann, Chem. Ber. 94, 1876 (1961).

[46] L. Birkofer u. A. Ritter, Chem. Ber. 93, 424 (1960).

[47] Th. Wieland u. B. Heinke, Liebigs Ann. Chem. 599, 70 (1956).

[48] G. W. Anderson u. R. Paul, J. Amer. chem. Soc. 80, 4423 (1958).

[49] L. Birkofer, W. Konkol u. A. Ritter, Angew. Chem. 71, 701 (1959); Chem. Ber. 94, 1263 (1961).

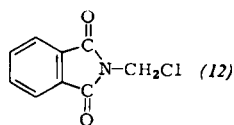
Die Trimethylsilylgruppe erfüllt also hier nicht die Funktion einer Schutzgruppe für den Stickstoff, sondern für die Carboxylgruppe.

### Schützende Reste an der Carboxylgruppe

Auch die Carboxylgruppen von N-Acylaminosäuren lassen sich mit dem Trimethylsilylrest substituieren, wenn man die Salze der Säuren mit Trimethylchlorsilan [50] oder Hexamethylsilazan reagieren läßt. Die Trimethylsilylester dürften die am leichtesten hydrolysierbaren Ester sein.

Von besonderer Nützlichkeit sind die in den letzten Jahren gut zugänglich gewordenen tert.-Butylester. Die tert.-Butylgruppe, von *Sheehan* erstmalig bei der Totalsynthese des Penicillins V verwendet [51], läßt sich unter besonders milden Bedingungen abspalten, zum Beispiel mit Toluolsulfonsäure in siedendem Benzol oder mit Trifluoressigsäure bei Zimmertemperatur. Die Veresterung von Aminosäuren mit tert.-Butanol gelingt nicht auf dem üblichen Weg. Man erhält die Ester am Stickstoff acylierter Aminosäuren durch Alkylierung mit tert.-Butylacetat in Anwesenheit saurer Katalysatoren, am besten Perchlorsäure [52], oder mit Isobutylen in Gegenwart von wenig konz. Schwefelsäure [53]. Diese Verfahren sind auch zur Veresterung freier Aminosäuren verwendbar, wobei infolge der Salzbildung mehr Perchlorsäure [54] bzw. Schwefelsäure [55] gebraucht wird. Bei diesen Reaktionen dürfte das tert.-Butylkation als alkylierendes Agens wirken. Ein besonderer Vorzug der tert.-Butylester ist ihre Stabilität gegenüber nicht zu starken Basen. So kann man die freien Ester ohne Dioxopiperazinbildung destillieren.

Ähnlich säurelabil sind die p-Methoxybenzylester [15]; man erhält sie zum Beispiel aus Carbobenzoxyminosäuren und Anisalkohol unter Wasserabspaltung mit Dicyclohexylcarbodiimid. Weiterhin gehört die von *Nefkens* [56] vorgeschlagene Phthalimidomethylgruppe zu den leicht durch Säuren abspaltbaren Resten. Man



führt sie durch Reaktion von Phthalimidomethylchlorid (12) mit den Anionen der acylierten Aminosäuren ein. Sie läßt sich auch mit Hydrazin entfernen. Den gegen-

[50] F. A. Henglein u. W. Knoch, Makromolekulare Chem. 28, 10 (1958).

[51] J. C. Sheehan u. K. R. Henery-Logan, J. Amer. chem. Soc. 79, 1263 (1957).

[52] E. Taschner, B. Liberek, Cz. Wasielewski u. J. F. Biernat, Angew. Chem. 71, 743 (1959); E. Taschner, C. Wasielewski u. J. F. Biernat, Liebigs Ann. Chem. 646, 119 (1961).

[53] G. W. Anderson u. F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).

[54] E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator u. T. Sokolowska, Liebigs Ann. Chem. 646, 134 (1961).

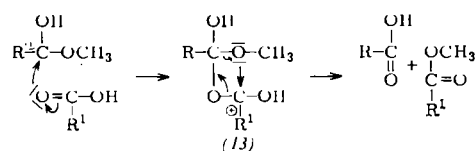
[55] R. W. Roeske, Chem. Industrie 1959, 1121.

[56] G. H. L. Nefkens, Nature (London) 193, 974 (1962).

teiligen Effekt, Resistenz auch gegen starke Säuren, bewirkt die p-ständige Nitrogruppe am Benzylrest. p-Nitrobenzylester von Aminosäuren und Peptiden sind gegen Bromwasserstoff in Eisessig wesentlich stabiler als die Benzylester [57]. p-Nitrobenzylester wurden durch Umsatz von p-Nitrobenzylbromid mit Acylaminosäuren in Gegenwart von Base [57,58] und anschließende Entfernung der Schutzgruppen am Stickstoff dargestellt. Die freien Ester sind jetzt leichter dadurch zugänglich, daß man freie Aminosäuren mit p-Nitrobenzylalkohol und Benzolsulfonsäure in Tetrachlorkohlenstoff unter Rückfluß erhitzt, wobei man das Kondensat zur Trocknung durch Silicagel leitet [59].

Methylester, die schon immer in der Peptidchemie eine große Rolle spielten, lassen sich gut und bequem durch Reaktion der freien Aminosäuren mit einer Lösung von Thionylchlorid in Methanol bei Zimmertemperatur erhalten [60,61]. Damit erübrigt sich heute die umständliche und nicht immer ganz befriedigende Anwendung von Chlorwasserstoff.

Bei der Veresterung von acylierten Aminosäuren kann man nach *Taschner* Lewis-Säuren in katalytischen Mengen verwenden. Am besten hat sich zur Darstellung von Methyl- [62] und Benzylestern [63] Sulfurylchlorid bewährt. Am Stickstoff acylierte Aminosäuren können auch mit Methyl- oder Äthylestern der Ameisensäure



oder Essigsäure in Anwesenheit von Schwefelsäure alkyliert werden [64]. Diese Alkylierung muß anders verlaufen als die oben erwähnte Übertragung einer tert.-Butylgruppe [52], vielleicht über ein protoniertes Addukt (13) durch intramolekulare O-Alkylwanderung.

## Methoden zur Kupplung

### Verwendung von Chloriden

Die klassische Methode der Verknüpfung mit den Chloriden geschützter Aminosäuren kehrt heute in einigen Varianten wieder. Man erzeugt die Chloride im Reaktionsansatz und läßt sie sogleich mit der Aminokompo-

[57] R. Schwyzer u. P. Sieber, Helv. chim. Acta 42, 972 (1959).

[58] H. Schwarz u. K. Arakawa, J. Amer. chem. Soc. 81, 5691 (1959).

[59] J. E. Shields, W. H. McGregor u. F. H. Carpenter, J. org. Chemistry 26, 1491 (1961).

[60] M. Brenner u. W. Huber, Helv. chim. Acta 36, 1109 (1953).

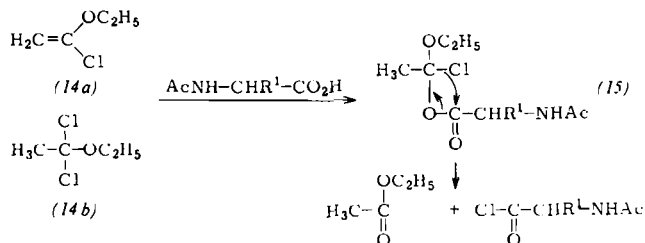
[61] R. A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud u. J.-P. Waller, Helv. chim. Acta 38, 1491 (1955).

[62] E. Taschner u. C. Wasielewski, Liebigs Ann. Chem. 640, 136 (1961).

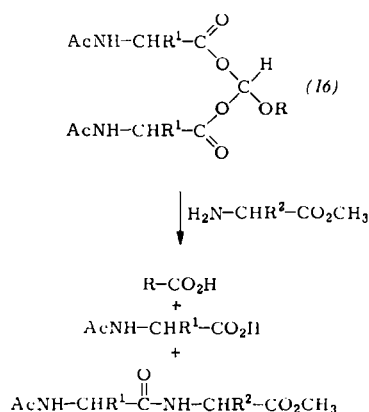
[63] E. Taschner u. C. Wasielewski, Liebigs Ann. Chem. 640, 139 (1961).

[64] E. Taschner u. C. Wasielewski, Liebigs Ann. Chem. 640, 142 (1961).

nente reagieren. *Heslinga* und *Arens* [65] fanden, daß beim Erhitzen von Acylaminosäuren oder Peptiden mit Aminosäureester-hydrochloriden und  $\alpha$ -Chlorvinyläther (14a) oder  $\alpha,\alpha$ -Dichlordiäthyläther (14b) unter Salzsäureentwicklung in guten Ausbeuten Peptide entstehen. Es wird angenommen, daß sich durch Reaktion von (14a) oder (14b) mit der acylierten Aminosäure über ein instabiles Zwischenprodukt (15) die Säurechloride bilden, welche mit der Basenkomponente so gleich weiterreagieren.



Der leichter zugängliche asymmetrische Dichlordimethyläther leistet nach *Rieche* [66] die gleichen Dienste. Tosyl- und Phthalylaminosäuren geben mit überschüssigem Reagens die Säurechloride in präparativ lohnender Weise; Carbobenzoxycarbonsäuren gehen dabei in die N-Carbaminsäure-anhydride über [67]. In Gegenwart von salzsäurebindenden Mitteln kann man aus dem Ansatz von zwei Mol Aminosäure und einem Mol Dichlormethyl-alkyläther gemischte Anhydride (16) von Acylaminosäuren und Orthoameisensäureester isolieren. Beim Umsatz mit Aminosäureestern reagiert nur einer der Aminoacylreste unter Peptidverknüpfung.



Auch das Reaktionsprodukt aus Dimethylformamid und Phosgen, das Chlorid des Dimethylimino-ameisensäurechlorids  $[(\text{CH}_3)_2\text{N}=\text{CH}-\text{Cl}]\text{Cl}$  [68] kann als Chlorierungsmittel für Acylaminosäuren dienen [69]. Mit diesem Reagens kann man zwischen Acylaminosäuren und Aminosäure- oder Peptidestern bei 0 °C eine Peptidbindung knüpfen.

[65] L. *Heslinga* u. J. F. *Arens*, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 76, 982 (1957).

[66] A. *Rieche* u. H. *Gross*, Chem. Ber. 92, 83 (1959).

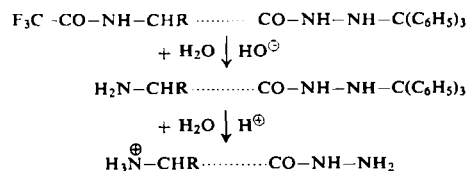
[67] K. *Poduska* u. H. *Gross*, Chem. Ber. 94, 527 (1961).

[68] H. H. *Bosshard*, R. *Mory*, M. *Schmid* u. H. *Zollinger*, Helv. chim. Acta 42, 1653 (1959).

[69] M. *Zaoral* u. Z. *Arnold*, Tetrahedron Letters 14, 9 (1960).

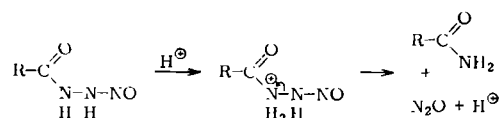
## Verwendung von Hydraziden und Aziden

Die Verwendung der Azide zur Kupplung nach *Curtius* hat sich im Laufe der letzten Jahre als die einzige Methode herausgestellt, bei der keine Racemisierung der aktivierten Peptidkomponente eintritt. Daher haben sich mehrere Autoren mit der Ausgestaltung dieser Arbeitsweise befaßt. Es galt vor allem, die schwierige Hydrazinolyse mancher langkettiger Peptidester zu umgehen. Deshalb wurde, nachdem man zuerst Carbobenzoxyhydrazide [70] empfohlen hatte, Tritylhydrazin [71] zur Einführung des Azidrests vorgeschlagen. Aus Trifluoracetylaminosäure und dem Hydrazinderivat erhält man mit Dicyclohexylcarbodiimid oder Carbonyldiimidazol die Trifluoracetylaminosäure- oder Trifluoracetylpeptid-tritylhydrazide, deren Trifluoracetylrest alkalisch abgespalten wird.



Nach weiterer Kettenverlängerung kann der Tritylrest durch Säuren abgespalten werden. Danach wird mit salpetriger Säure das Azid hergestellt. Auch die Verwendung von tert.-Butyloxycarbonylhydrazin in Kombination mit der katalytisch mit Wasserstoff zu entfernenden Carbobenzoxyschutzgruppe wurde empfohlen [72]. Auch hier wird die Kupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid [72] oder nach der Anhydridmethode [73] vorgenommen.

Die Bildung der Säureazide aus Hydraziden und salpetriger Säure ist unter Umständen von einer mehr oder weniger starken Nebenreaktion begleitet, der Abspaltung von  $\text{N}_2\text{O}$  aus dem primären N-Nitrosohydrazid unter Bildung des Säureamids. Diese Nebenreaktion



kann durch Anwendung höherer Protonen- und Nitrit-Konzentrationen oder durch Nitrosieren in einem organischen Lösungsmittel mit Salpetrigsäureestern oder Nitrosylchlorid vermieden werden [74].

Hydrazide auch reaktionsträger Peptide bilden sich sehr leicht aus den Thiophenylestern [75]. Da man die Azidgruppe auch nach der Methode der gemischten Anhy-

[70] K. *Hofmann*, A. *Lindenmann*, M. Z. *Magge* u. N. H. *Khan*, J. Amer. chem. Soc. 74, 470 (1952).

[71] F. *Weygand* u. W. *Steglich*, Chem. Ber. 92, 313 (1959).

[72] R. *Schwyzer*, Angew. Chem. 71, 742 (1959); Chimia 14, 366 (1960).

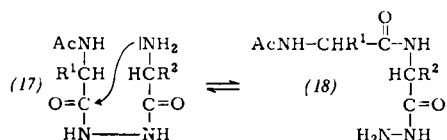
[73] R. A. *Boissonnas*, St. *Guttmann* u. P. A. *Jaquenoud*, Helv. chim. Acta 43, 1349 (1960).

[74] J. *Honzl* u. J. *Rudinger*, Collect. czechoslov. chem. Commun. 26, 2333 (1961).

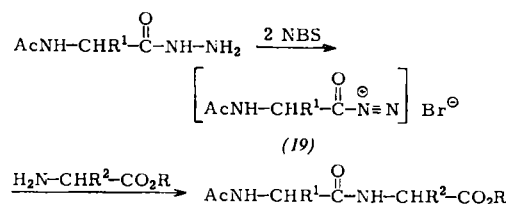
[75] Th. *Wieland* u. B. *Heinke*, Liebigs Ann. Chem. 615, 184 (1958).

dride einführen kann [76,77], wird vielleicht dieses Verfahren auch in der Peptidchemie Anwendung finden.

Das Prinzip der Aminoacyl-Einlagerung läßt sich nach *Brenner* und Mitarbeitern [78] neuerdings auch auf Hydrazinderivate ausdehnen. N,N'-Diaminoacylhydrazine, deren eine Aminogruppe acyliert ist (17), erleiden in Gegenwart organischer Säuren oder Basen eine Umlagerung zu den Peptidhydraziden (18). Das ist die Umkehrung der von *Kurtz* und *Niemann* [79] beobachteten Isomerisierung eines Acylaminosäurehydrazids zum Diacylhydrazin. Zur Aminoacylierung setzt man die Hydrazide am besten mit den inneren Carbaminsäureanhydriden in Eisessig um. Die Peptidhydrazide können dann entweder nach der hier geschilderten Methode oder auf dem klassischen Weg über die Azide verlängert oder mit unterbromiger Säure zu den Peptiden mit freier Carboxylgruppe oxydiert werden.



Bei der Oxydation mit N-Bromsuccinimid (NBS) bilden die Hydrazide von Carbobenzoxycarbonsäuren oder Peptiden, wenn ein Aminosäure- oder Peptidester zugegen ist, mit sehr guter Ausbeute und ohne nennenswerte Racemisierung Peptide [80]. Man kann die Reaktion auch



zur Darstellung von Polypeptiden aus Tripeptidhydraziden verwenden. Über den Mechanismus der Reaktion, die vielleicht über ein Acyldiazoniumsalz (19) verläuft, ist noch nichts Näheres bekannt.

#### Verwendung von ungesättigten Verbindungen

Verbindungen mit additionsfreudigen Doppelbindungen können Acylaminosäuren zu reaktionsfähigen Zwischenprodukten anlagern. Diese werden, wenn man Peptide herstellen will, nicht isoliert, sondern im Ansatz mit der Basenkomponente kondensiert. Zur Klärung des Reaktionsmechanismus der Aktivierung von Carboxylgruppen durch Carbodiimide wurden Versuche in Abwesenheit der zu kuppelnden Komponente angestellt. Hierbei konnten gemäß der bekannten Wirkung

[76] P. R. Bhandari, Dissertation, Universität Mainz, (1953).

[77] J. Weinstock, J. org. Chemistry 26, 3511 (1961).

[78] M. Brenner u. W. Hofer, Helv. chim. Acta 44, 1794 (1961); ibid. 44, 1798 (1961); R. Weber, W. Hofer, W. Heer u. M. Brenner, Helv. chim. Acta 44, 2154 (1961).

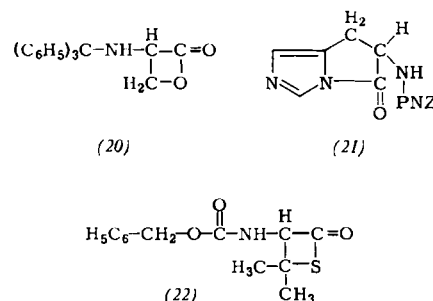
[79] A. N. Kurtz u. C. Niemann, J. Amer. chem. Soc. 83, 3309 (1961).

[80] Y. Wolman, P. M. Gallop u. A. Patchornik, J. Amer. chem. Soc. 83, 1263 (1961).

dieser Reagentien [81] bei mehreren Carbobenzoxy- oder Phthalylaminosäuren [82,83] die symmetrischen Anhydride isoliert werden, die sich mit Aminosäureestern bekanntlich zu Peptiden umsetzen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß solche Anhydride auch als Zwischenprodukte bei Peptidsynthesen mit Dicyclohexylcarbodiimid [84] auftreten.

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-tert.-butylcarbodiimid [85] gibt bei der Wasseraufnahme während der Peptidsynthese einen Harnstoff, der in verdünnten Säuren löslich und daher leicht zu entfernen ist. Dasselbe gilt für weitere basische Carbodiimide, von denen sich nach *Sheehan* [86] vor allem N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid bewährt hat. Man erhält sie aus Harnstoffen durch Wasserabspaltung mit Tosylchlorid und Triäthylamin. Sie lassen sich in Äther zu den ebenfalls brauchbaren Methosalzen methylieren.

Die wasserabspaltende Wirkung der Carbodiimide wurde von *Sheehan* [87,88] zur Darstellung einiger in sich selbst aktivierter Aminosäurederivate benutzt. N-Tritylserin gibt ein  $\beta$ -Lacton (20), das sich mit Alaninmethylester ohne Racemisierung zum Dipeptidesterderivat umsetzt. N-p-Nitrocarbobenzoxycarbonsäure-histidin gibt das Lactam (21), das ebenfalls acylierend wirkt; die gleiche Wirkung hat das  $\beta$ -Thiolacton von N-Carbobenzoxycarbonsäure-3,3-dimethylcystein (22).



Cyanamid, das vielleicht in seiner tautomeren Form als Carbodiimid reagiert, aber auch unsymmetrisch dialkylierte Cyanamide, vermitteln beim zweistündigen Erhitzen auf 100 °C ohne Lösungsmittel die Peptidsynthese zwischen Carbobenzoxycarbonsäuren und Aminosäureestern mit 60 bis 70% Ausbeute [89]. Auch im letzten Fall dürften acylierte Isoharnstoffderivate die eigentlichen Überträger des Acylrestes sein.

[81] F. Zetzsche u. H. Lindlar, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 2095 (1938); F. Zetzsche u. A. Fredrich, ibid. 72, 363 (1939).

[82] H. Schüssler u. H. Zahn, Chem. Ber. 95, 1076 (1962).

[83] I. Muramatsu u. A. Hagitani, J. chem. Soc. Japan 80, 1497 (1959); Chem. Abstr. 55, 6394 (1961); I. Muramatsu, J. chem. Soc. Japan 82, 83 (1961); Chem. Abstr. 56, 10273 (1962).

[84] J. C. Sheehan u. G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

[85] DBP. 1070639 (Dezember 1959), Farbenfabr. Bayer A.G., Erf.: H. B. König u. F. Moosmüller, Chem. Abstr. 55, 11324 (1961).

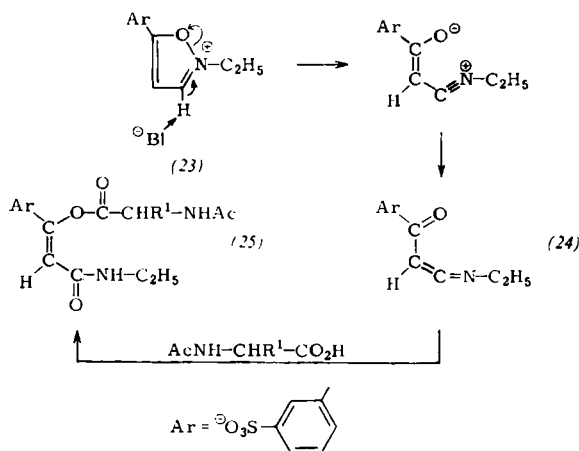
[86] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank u. G. L. Boshart, J. org. Chemistry 26, 2525 (1961).

[87] J. C. Sheehan, Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 665 (1960); Chem. Abstr. 55, 25779 (1961).

[88] J. C. Sheehan, K. Hasspacher u. Y. L. Yeh, J. Amer. chem. Soc. 81, 6086 (1959).

[89] G. Losse u. H. Weddige, Angew. Chem. 72, 323 (1960); Liebig's Ann. Chem. 636, 144 (1960).

Mit besonderem Interesse aufgenommen wurde die Einführung eines neuen Reagens zur Herstellung von Peptiden durch *Woodward* und Mitarbeiter [90]. Für 16 Beispiele von Di- und Tripeptidsynthesen mit N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (23) werden Ausbeuten von 75 bis 93% angegeben, ohne daß nennenswerte Racemisierung erfolgte. Zum Mechanismus der interessanten Reaktion wird angenommen, daß der dem positiven Stickstoff benachbarte Wasserstoff durch eine



Base als Proton entfernt wird, worauf unter Ringöffnung ein Oxoketenimin (24) entsteht [91]. An dieses lagert sich die geschützte Aminosäure unverzüglich an, wobei nach Acylwanderung das eigentlich reagierende O-Aminoacyl-enol (25) gebildet wird.

#### Verwendung von aktivierten Estern

Einer der ersten Verbindungstypen dieser Art, die Cyanmethylester-Gruppierung [92], ist unter anderem bei einer Tripeptidsynthese ohne Isolierung der Zwischenprodukte verwendet worden [93]. Dabei wurde auch gefunden, daß bei der Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig durch Hydratisierung am Nitril-Kohlenstoff Glykolsäureamidester  $H_2N-CHR-COOCH_2-CONH_2$  entstehen, die keine acylierenden Eigenschaften mehr aufweisen. In der zitierten Arbeit werden auch Dipeptid-p-nitrophenylester als aktivierte Dipeptide verwendet. Man setzt zum Beispiel zuerst Carbobenzoxycarbonsäuren mit Aminoacyl-p-nitrophenolen nach der Anhydridmethode oder mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid zu Carbobenzoxy-dipeptid-p-nitrophenylestern um, die ohne Isolierung mit einem Aminosäureester reagieren. Die p-Nitrophenylester kann man aus Acylaminosäuren und dem Schwefligsäureester  $OS(OAr)_2$  oder dem Phosphorigsäureester  $P(OAr)_3$  [94] sowie auch aus den

Komponenten mit Dicyclohexylcarbodiimid [95–97] erhalten. Auch Erhitzen der Säuren mit Di-p-nitrophenylcarbonat  $OC(OAr)_2$  [98] führt zum Ziel. Nach der Sulfid- und Phosphitmethode sind außerdem zahlreiche weitere Phenylester hergestellt worden [94]. Die p-Methylsulfonylphenylester werden neuerdings [99] wegen der Resistenz dieser Gruppierung dann mit Erfolg verwendet, wenn die Schutzgruppe am Stickstoff durch katalytische Hydrierung abgespalten werden muß. Phenylester acylierter Aminosäuren, die viel weniger aktiv [100] sind, z. B. der Carbobenzoxy-glutaminsäure- $\alpha$ -phenylester, haben sich zur Synthese von  $\alpha$ -Glutamylpeptiden bewährt [101].

2.4.6-Trichlorphenylester von mehreren am Stickstoff geschützten Aminosäuren haben sich als brauchbare Acylierungsmittel zur Synthese von Dipeptiden bei Raumtemperatur erwiesen [102].

Während bisher alle Peptidsynthesen mit aktivierten Aminosäureestern in Gegenwart von Basen ausgeführt wurden, fanden *Weygand* und *Steglich* [103], daß aktivierte Ester, besonders gut die Carbobenzoxy-amino-säurethiophenylester, mit freien Aminosäuren beim Kochen in Eisessig zu Peptiden reagieren. Durch das Lösungsmittel scheint die Zwitterionenform der Aminosäuren infolge Einwirkung auf beide polare Gruppen zum Teil aufgehoben zu werden. Die erforderliche Reaktionszeit und die Ausbeuten sind sehr stark von sterischen Faktoren abhängig. Während Carbobenzoxycyclyl-glycin in 60 Minuten mit 62% Ausbeute entsteht, liefert die Umsetzung von Carbobenzoxy-leucinthiophenylester mit Alanin in 10,5 Stunden nur 43% Peptid. In einer Nebenreaktion wird der Stickstoff der Aminosäurekomponente acyliert. Bei Phthalylaminosäurethiophenylestern wirkt sich die sterische Hinderung noch ungünstiger aus [28].

Um die sterische Hinderung möglichst gering zu halten, wurden aus einigen Acylaminosäuren durch Umvinylierung mit Vinylacetat und Palladiumchlorid die aktivierten Vinylester dargestellt [104]. Der bei der Kondensation mit Aminosäureestern auftretende Acetaldehyd wird dabei durch das Lösungsmittel abgefangen. Einige Dipeptidester entstehen hierbei mit über 80% Ausbeute. Als neue aktivierte Ester führten *Nefkens* und *Tesser* [105] die Hydroxyphthalimid-„ester“ (26) der Carbobenzoxycarbonsäuren in die Peptidchemie ein.

[90] R. B. Woodward, R. A. Olofson u. H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. 83, 1010 (1961).

[91] R. B. Woodward u. R. A. Olofson, J. Amer. chem. Soc. 83, 1007 (1961).

[92] R. Schwyzer, M. Feurer, B. Iselin u. H. Kägi, Helv. chim. Acta 38, 80 (1955).

[93] M. Goodman u. K. C. Stueben, J. Amer. chem. Soc. 81, 3980 (1959).

[94] B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber u. R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 40, 373 (1957).

[95] M. Rothe u. F.-W. Kunitz, Angew. Chem. 68, 414 (1956); Liebigs Ann. Chem. 609, 88 (1957).

[96] D. F. Elliot u. D. W. Russel, Biochem. J. 66, 49P (1957).

[97] M. Bodánszky u. V. Du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

[98] Th. Wieland, B. Heinke, K. Vogeler u. H. Morimoto, Liebigs Ann. Chem. 655, 189 (1962).

[99] R. Schwyzer u. P. Sieber, Helv. chim. Acta 41, 2190 (1958).

[100] Th. Wieland u. W. Schäfer, Angew. Chem. 63, 146 (1951); Th. Wieland u. F. Jaenicke, Liebigs Ann. 599, 125 (1956); vgl. [103].

[101] E. Klieger u. H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. 655, 195 (1962).

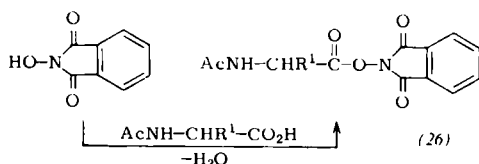
[102] G. Kupryszewski, Roczniki Chem. 35, 595 (1961); Chem. Abstr. 55, 27121 (1961).

[103] F. Weygand u. W. Steglich, Chem. Ber. 93, 2983 (1960).

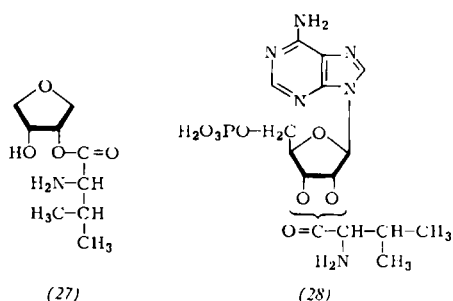
[104] F. Weygand u. W. Steglich, Angew. Chem. 73, 757 (1961).

[105] G. H. L. Nefkens u. G. J. Tesser, J. Amer. chem. Soc. 83, 1263 (1961).

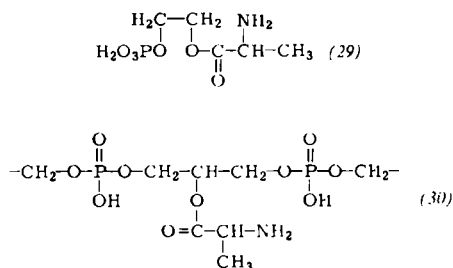
Man erhält diese Ester in mäßigen bis guten Ausbeuten mit Dicyclohexylcarbodiimid aus Carbobenzoxycarbonsäuren und N-Hydroxyphthalimid, dargestellt aus Hydroxylamin und dem Phthalylierungsreagens [27] N-Carbäthoxyphthalimid (7).



Die in der Natur auftretenden aktiven Aminosäuren, 2'- oder 3'-Aminosäureester mit den in spezifischen, löslichen Ribonucleinsäuren endständigen Adenosinresten [106], lassen sich bisher nur enzymatisch darstellen. Um die für Alkylester ungewöhnlich leichte Aminolysierbarkeit dieser Ester zu verstehen, haben Zachau und Karau [107] sowie Wieland, Merz und Pfeleiderer [108] Aminosäureester einiger cyclischer Glykole synthetisiert und die Geschwindigkeit ihrer Reaktion mit Hydroxylamin mit der von Aminosäureestern einiger Nucleotide verglichen. Dabei zeigte sich ein beschleunigender Einfluß einer freien benachbarten Hydroxylgruppe und eines im Ring befindlichen Sauerstoffatoms. Der Valinester des cis-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (27), die aktivste Verbindung, reagiert aber immer noch wesentlich langsamer mit Hydroxylamin als 2'- (oder 3'-)Valyl-adenosin-5'-phosphorsäure (28), woraus auf eine zusätzliche



Wirkung des Purinstickstoffs, vielleicht auch der Phosphorsäure, geschlossen werden muß. Eine solche Wirkung findet man beim Vergleich der Geschwindigkeit der Hydroxylaminspaltung von 1-DL-Alanyl-2-phosphorylglykol (29), Alanylglykol und Alaninmethylester [109]. Auch in den Teicholsäuren (Teichoic Acids) (30) von Bakterienzellwänden, D-Alaninestern von Polyglycerin-



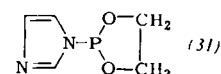
- [106] H. G. Zachau, G. Acs u. F. Lipmann, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 885 (1958).  
 [107] H. G. Zachau, Chem. Ber. 93, 1822 (1960); H. G. Zachau u. W. Karau, Chem. Ber. 93, 1830 (1960).  
 [108] Th. Wieland, H. Merz u. G. Pfeleiderer, Chem. Ber. 93, 1816 (1960).  
 [109] Z. A. Shabarowa, N. A. Hughes u. J. Baddiley, Biochem. J. 83, 216 (1962).

phosphat oder Poly-(ribit-1.5-diphosphat) wurde eine Reaktivität der esterartig gebundenen Alaninreste beobachtet, die mit jener der aktivierten Aminosäuren der Zelle etwa übereinstimmt [110].

#### Verwendung von Phosphorderivaten

Zu den vielen Phosphorderivaten, die als Anhydridkomponenten zur Aktivierung von Aminosäuren vorgeschlagen wurden, ist die Diphenylphosphorsäure (als Chlorid) hinzugekommen [111].

Phosphorpentoxyd als Reagens zur Peptidsynthese haben Schramm und Wissmann eingeführt. Das Verfahren wurde an einigen Peptiden erprobt, wobei geschützte Aminosäureester in Diäthylphosphit gelöst und mit Tributylamin und P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> auf dem Dampfbad erhitzt wurden [112]. Diese Aktivierung, bei der Dipeptide racemisieren, eignet sich besonders zur Darstellung größerer Mengen von Dipeptiden, da man sehr konzentrierte Lösungen verwenden kann. Man nimmt an, daß aus P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und Diäthylphosphit entstandene Polyphosphorsäure-äthylester die eigentlichen Kondensationsmittel sind. Von den Derivaten der phosphorigen Säure, die zur Peptidverknüpfung nützlich sind, wurden außer dem früher üblichen Tetraäthylpyrophosphit das Bis-o-phenylenpyrophosphit aus Brenzkatechin und Phosphor-trichlorid [113] und das Diäthyl-äthylen-pyrophosphit [18] empfohlen. Bei Peptidsynthesen mit diesem Reagens hat Imidazol in äquivalenter Menge einen fördernden Effekt. Anderson [114] hat daher Äthylen-phosphorig-säure-imidazolid (31) synthetisiert und an Stelle der



Reagentienmischung als Kondensationsmittel verwendet. Er erhielt um etwa 10% höhere Ausbeuten als bei der Pyrophosphitmethode ohne Imidazol.

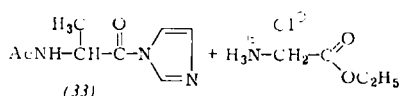
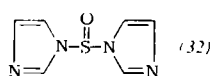
#### Verwendung von Azolen

Über die oben geschilderte Wirkungsweise des Imidazols wird nichts berichtet, doch kann man sich vorstellen, daß das Aminosäureimidazolid Zwischenprodukt ist. Seit diese energiereichen Verbindungen [115], die nach Paul und Anderson ohne Isolierung gekuppelt werden können [48], durch die sehr leicht eintretende Umsetzung des N,N'-Carbonyldiimidazols [116] mit geschützten Peptiden und Aminosäuren zugänglich geworden sind, haben sich die Erfinder dieses Verfahrens mit der Ausarbeitung der optimalen Bedingun-

- [110] A. R. Archibald, J. J. Armstrong, J. Baddiley u. J. B. Hay, Nature (London) 191, 570 (1961).  
 [111] A. Cosmatos, J. Photaki u. L. Zervas, Chem. Ber. 94, 2644 (1961).  
 [112] B. F. Erlanger u. N. Kokowsky, J. org. Chemistry 26, 2534 (1961).  
 [113] P. C. Crafts, J. H. H. Markes u. H. N. Rydon, J. chem. Soc. (London) 1959, 3610.  
 [114] G. W. Anderson, Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 676 (1960).  
 [115] Th. Wieland u. G. Schneider, Liebigs Ann. Chem. 580, 159 (1953).  
 [116] H. A. Staab, Liebigs Ann. Chem. 609, 75 (1957).



gen beschäftigt [117]. Carbobenzoxymethyl-L-phenylalanyl-glycinäthylester, der – wie weiter unten geschildert – das am meisten verwendete Testobjekt für Racemisierung ist, konnte mit 90 % Ausbeute, davon 5 % DL-Tripeptid, erhalten werden. Bei der Bildung des Acylimidazols wurde ein Überschuß von Carbonyldiimidazol vermieden und unter Ausschluß von Feuchtigkeit gearbeitet. Die Kupplungskomponente, z. B. Salze von Aminosäuren, kann dann auch in Gegenwart von Wasser zugegeben werden, doch wird die Verwendung von Estern ohne Wasser mehr empfohlen. Das von *Staab* und *Wendel* [118,119] später beschriebene Thionylidiimidazol (32), das sich aus Thionylchlorid und vier Äquivalenten Imidazol in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur leicht bildet, kann ebenfalls ohne Isolierung für eine „Eintopf“-Peptidsynthese verwendet werden [120]. Verbindung (32) reagiert bei 0 °C mit Carbobenzoxylanin zum Imidazolid (33), auch wenn die Esterkomponente – als Hydrochlorid geschützt –



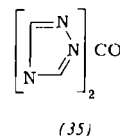
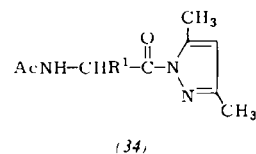
anwesend ist. Erst bei Zugabe von Triäthylamin tritt Kupplung zum Peptid ein. Die Ausbeuten betragen bisher 75 %, könnten aber wohl noch gesteigert werden.

Ein Phosphoryldiimidazol, Phenylphosphorsäure-diimidazolid, ist ebenfalls imstande, einen Imidazolrest zur Bildung eines Acylaminosäure-imidazolids zur Verfügung zu stellen, das mit Alanin zum Peptid umgesetzt wurde [121].

Freies Imidazol vermag bekanntlich [122] die Hydrolyse reaktionsfähiger Ester zu katalysieren. Der Vorgang, bei dem die intermediäre Bildung eines N-Acylimidazols diskutiert wird [123], läßt sich auch zu einer Aktivierung von Acylaminosäurealkylestern benutzen [124]. Carbobenzoxy-alaninmethylester gibt bei mehrstündigem Rühren mit Natriumglycinat in flüssigem Imidazol bei 89 °C über 60 %, mit dem besser löslichen Tetraäthylammoniumsalz des Glycins über 70 % Ausbeute an Carbobenzoxydipeptid, während ohne Imidazol keine Verknüpfung eintritt. Mit Glycin-tert.-butylester läßt sich unter den gleichen Bedingungen sogar eine Ausbeute von 75 bis 80 % an Carbobenzoxydipeptidester erzielen. Bei dieser Gelegenheit haben wir gefunden, daß der Phthalylrest durch Erhitzen mit Imidazol in Gegenwart von wenig Wasser rasch abgespalten wird.

- [117] R. Paul u. G. W. Anderson, J. Amer. chem. Soc. 82, 4596 (1960).  
 [118] H. A. Staab u. K. Wendel, Chem. Ber. 93, 2902 (1960).  
 [119] H. A. Staab, Angew. Chem. 74, 407 (1962).  
 [120] Th. Wieland u. K. Vogeler, Angew. Chem. 73, 435 (1961).  
 [121] F. Cramer u. H. Schaller, Chem. Ber. 94, 1634 (1961).  
 [122] Vgl. M. L. Bender, Chem. Reviews 60, 53 (1960).  
 [123] M. L. Bender u. B. W. Turnquest, J. Amer. chem. Soc. 79, 1656 (1957).  
 [124] Th. Wieland u. K. Vogeler, Angew. Chem. 74, 904 (1962).

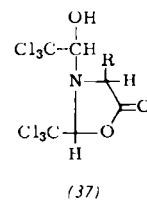
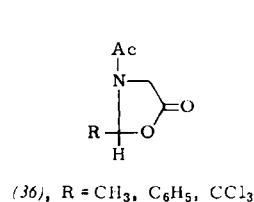
Die 3,5-Dimethylpyrazolide (34) von N-Acylaminosäuren und Peptiden sind bedeutend weniger reaktionsfähig als die Imidazole [125]. Sie können aus den Säuren mit dem Pyrazol nach der „Anhydridmethode“ dargestellt werden [126]. Als weiteres Azol ist 1,2,4-Triazol in Form seiner N,N'-Carbonyl-bis-Verbindung (35) als



Kupplungsreagens in die Peptidchemie eingeführt worden [127]. Man erhält es wie Carbonyldiimidazol [115], wobei der Zusatz von einem Mol Pyridin zum Abfangen der Säuren die Ausbeute erhöht. Die Verbindung, bei der die Bindungsstelle der Carbonylgruppe nicht genau bekannt ist, reagiert beim Aktivierungsschritt langsamer als das Imidazolanaloge, nicht aber beim Kupplungsschritt. Die Triazole setzen sich zum Beispiel in Dimethylformamid bei Zimmertemperatur unter Peptidverknüpfung rasch mit Aminosäure- oder Peptidestern um.

#### Sonstige Methoden

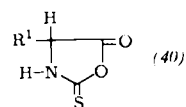
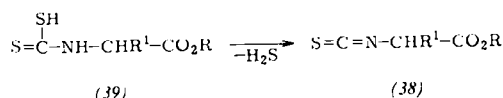
**Oxazolidone.** – In letzter Zeit ist auch das Oxazolidon-Verfahren von *Micheel* und Mitarbeitern weiter ausgebaut worden. Es läßt sich auf Tosyl-L-glutaminsäure [128] und auf weitere Tosyl-L-aminosäuren [129] anwenden und gibt Dipeptide ohne Racemisierung. Zur Bildung des Ringes werden jetzt Essigsäureanhydrid und Thionylchlorid (in katalytischen Mengen) angewendet. Auch Carbobenzoxy-glycin wurde unter Wasserabspaltung mit Paraldehyd, Benzaldehyd oder Chloral in Oxazolidone (36) übergeführt [130]. Die besten Ausbeuten an Oxazolidon erhält man mit Chloral; dieser Aldehyd kann nach *Dane* und Mitarbeitern [131] sogar mit freien Aminosäuren 1,3-Oxazolidon-5-Derivate



(37) geben, in denen der Stickstoff den Hydroxytrichloräthylrest trägt. Diese Verbindungen reagieren bei 20 bis 40 °C glatt mit Aminen und ergeben mit Glycinestern die N-Formyl-dipeptidester.

- [125] W. Ried u. A. Czack, Liebigs Ann. Chem. 642, 133 (1961).  
 [126] W. Ried u. K. Marquard, Liebigs Ann. Chem. 642, 141 (1961).  
 [127] H. C. Beyermann u. W. Maassen van den Brink, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 80, 1372 (1961).  
 [128] F. Micheel u. H. Haneke, Chem. Ber. 92, 309 (1959).  
 [129] F. Micheel u. H. Haneke, Chem. Ber. 95, 1009 (1962).  
 [130] F. Micheel u. W. Meckstroth, Chem. Ber. 92, 1675 (1959).  
 [131] E. Dane, R. Heiss u. H. Schäfer, Angew. Chem. 71, 339 (1959); DBP. 1079648 (April 1960), Farbenfabr. Bayer A.G., Erf.: E. Dane, R. Heiss u. H. Schäfer; Chem. Abstr. 55, 25784 (1961).

**Kohlensäurederivate.** – Die gemischten Alkylkohlensäure-anhydride verdienen immer noch Beachtung, obwohl methodische Neuigkeiten nicht dazugekommen sind. Von theoretischem Interesse sind Studien zum Mechanismus der Zersetzung von gemischten Carbonsäure-Kohlensäureanhydriden (Bildung von Ester und CO<sub>2</sub>; Disproportionierung) am Beispiel des Anhydrids aus Benzoesäure und n-Butylkohlensäure; für die Zersetzung wird Basenkatalyse angenommen [132]. Von der Carbobenzoyl-ε-aminocaprinsäure kann man durch Umsetzen mit Pyrokohlensäurediäthylester solche gemischten Anhydride erhalten und diese in bekannter Weise zur Acylierung der Aminogruppe einer zweiten Komponente verwenden [133]. In der Reihe der α-Aminosäuren ist eine solche Synthese jedoch nicht möglich [98]. Cyanursäurechlorid setzt sich mit acylierten Aminosäuren in Gegenwart einer tertiären Base bei 0 °C zu einer anhydridartigen Verbindung um, die mit einem Aminosäureester ein Dipeptid liefert. Aus Carbobenzoyl-alanin und Glycinester entstand so mit 77% Ausbeute der Dipeptidester. Bei der Aktivierung eines Dipeptids trat jedoch weitgehende Racemisierung ein [134]. Auch die Carbobenzoyl-Gruppe kann zur Peptidverknüpfung dienen. N-Carbobenzoyl-aminosäureester geben beim Zusammenschmelzen mit Phthalylaminosäuren unter Kohlensäure-Entwicklung Dipeptidester [98]. Als Mechanismus kommt hierbei die primäre Abspaltung von Benzylalkohol in Frage, bei der ein Isocyanat-fettsäureester entsteht, der sich in bekannter Weise unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung mit Acylaminosäuren kondensiert. Ähnlich verhalten sich die α-Isothiocyanat-fettsäureester [89] (38), die Kohlenoxysulfid abspalten. Man erhält sie aus Aminosäureestern mit Schwefelkohlenstoff und Alkali dadurch, daß man den zunächst gebildeten Dithiocarbaminaten (39) mit HgCl<sub>2</sub> Schwefelwasserstoff entzieht. Bei der Behandlung von freien Aminosäuren mit Schwefelkohlenstoff entstehen ebenfalls Isothiocyanate, die aber nicht isoliert werden können. Sie reagieren wahrscheinlich über innere Thiocarbaminsäure-anhydride (40) zu Polypeptiden.



Auch N-(Phenylthiocarbonyl)-aminosäuren H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>-S-CO-NH-CHR<sup>1</sup>-CO<sub>2</sub>H und -peptide [135] sowie N-(Phenylloxycarbonyl)- und N-(o-Nitrophenylloxycarbonyl)-aminosäurederivate [136] zeigen diese Polymerisationsbereitschaft.

**Andere gemischte Anhydride.** – Grundsätzlich könnte man alle aktivierten Derivate von Acylaminosäuren als

[132] E. J. Longosz u. D. S. Tarbell, J. org. Chemistry 26, 2161 (1961).

[133] W. Thoma u. H. Rinke, Liebigs Ann. Chem. 624, 30 (1959).

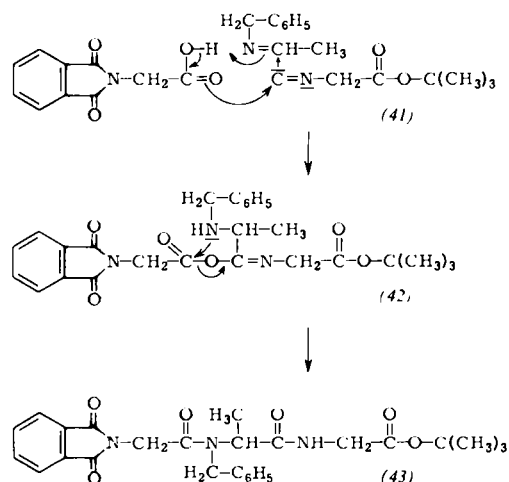
[134] Th. Wieland u. P. Duesberg, unveröffentlicht.

[135] J. Noguchi u. T. Hayakawa, J. Amer. chem. Soc. 76, 2846 (1954).

[136] Y. Ishizuka, Nippon Kagaku Zasshi 77, 1426 (1956); Chem. Abstr. 53, 5149 (1959).

gemischte Anhydride betrachten. Eine neuere Zusammenfassung [6] über Methoden zur Peptidverknüpfung geht von dieser Betrachtungsweise aus, doch soll hier die feinere Aufgliederung beibehalten werden. Diphenylketen bildet mit acylierten Aminosäuren bei -15 °C sehr rasch gemischte Anhydride der Diphenyllessigsäure. Infolge sterischer Hinderung kann nur die Aminoacylhälfte mit Aminosäureestern unter Peptidbildung reagieren [137]. Benzolsulfonsäure als Anhydridkomponente kann leicht durch Reaktion von Acylaminosäuren mit Benzolsulfochlorid eingeführt werden. Solche Anhydride sind auch zur Peptidsynthese benutzt worden [138], scheinen aber, wie bei der Toluolsulfonsäure als Anhydridkomponente in jüngster Zeit nochmals festgestellt wurde [139], keine besonderen Vorteile zu bieten. Die Verwendung von Toluolsulfochlorid zur Veresterung mit reaktionsträgen Alkoholen, wobei sich intermediär das gemischte Anhydrid bildet, ist schon 1955 empfohlen worden [140]. Auch Methansulfonsäurechlorid hat schon zur Knüpfung einer Peptidbindung gedient [141].

**Passerini-Reaktion.** – Unter gleichzeitiger Knüpfung zweier Peptidbindungen verläuft eine bemerkenswerte Anwendung der Passerini-Reaktion in Anwesenheit eines Amins, wie sie von Ugi [142] beschrieben wurde.



Als Beispiel sei die Reaktion des Isocyanessigsäure-tert.-butylesters (41) angeführt, den man aus N-Formylglycine-tert.-butylester durch Wasserabspaltung mit Phosgen und Triäthylamin erhält. (Die Reaktion verläuft analog der Isonitrilsynthese aus Formamiden mit Phosphoroxychlorid in Pyridin [143]). In einem Mehrzentrenprozeß reagiert der Ester (41) bei Raumtemperatur in fünf Stunden mit Phthalylglycine, Benzylamin und Acetaldehyd (= Schiffsche Base) über ein O-Acylpeptid (42) zum Phthalylglycyl-(N-benzyl-DL-alanyl)-glycine-tert.-butylester (43) mit 73% Ausbeute.

[137] G. Losse u. E. Demuth, Chem. Ber. 94, 1762 (1961).

[138] E. Taschner, Collect. czechoslov. chem. Commun. 24, 26 (1959); vgl. auch Chem. Abstr. 52, 16236 (1958).

[139] D. Theodoropoulos u. J. Gazopoulos, J. org. Chemistry 27, 2091 (1962).

[140] J. H. Brewster u. C. J. Ciotti, J. Amer. chem. Soc. 77, 6214 (1955).

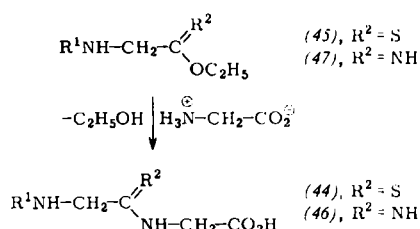
[141] F. C. McKay, zitiert von N. F. Albertson [6].

[142] I. Ugi, Angew. Chem. 74, 9 (1962).

[143] I. Ugi u. R. Meyr, Chem. Ber. 93, 239 (1960).

Obwohl die mittlere Aminosäure zwangsläufig racemisch auftritt, kann die elegante Reaktion für die Peptidchemie Bedeutung erlangen. Ohne Amin entsteht bei der analogen Reaktion das Depsipeptid [144].

**Entartete Peptide.** – Über die Stoffklasse der Depsipeptide, auch Peptolide genannt [145], der mehrere interessante Naturstoffe angehören, hat *Schemjakin* kürzlich zusammenfassend berichtet [146]. Außer den dort geschilderten Syntheseprozessen, die *Schemjakin* neuerdings zur Darstellung optisch aktiver Depsipeptide angewendet hat [147], wurde ein Verfahren beschrieben, nach dem speziell der Glykolsäurerest über Diazoacetylaminosäurederivate [148,149] in Esterbindung gebracht werden kann. Mit der Synthese anderer peptidartiger Verbindungen haben sich *Ried* und Mitarbeiter befaßt. Sogenannte Endothiopeptide (44) wurden durch Kondensation von Acylaminothionsäureestern (45) mit Salzen von Aminosäuren erhalten [150]; Imidopeptide (46) bilden sich in ähnlicher Weise [151] aus Iminoestern (47).



### Synthese cyclischer Peptide

Versuche zur Herstellung cyclischer Peptide definierten Baus beherrschen weiterhin ein Teilgebiet der Peptidchemie. Systematische Studien zum Effekt der Verdünnung, welche hier bekanntlich notwendig ist, sind – allerdings an einem „entarteten“ Modell – von *Rothe* und Mitarbeitern angestellt worden [152]. Die Cyclisierung von  $\epsilon$ -Aminocaproyl- $\epsilon$ -aminocapronsäurechlorid, aus dem Hydrochlorid mit Triäthylamin in Dimethylformamid in Freiheit gesetzt, liefert innerhalb von zwei Stunden bei 154 °C die in Tabelle 1 gezeigten Ausbeuten. Sie hängen von der Verdünnung ab.

Tabelle 1. Ausbeuten bei der Cyclisierung von  $\epsilon$ -Aminocaproyl- $\epsilon$ -aminocapronsäurechlorid.

Konzentration [Mol/l]	Ausb. [%]
0,001	37
0,002	30
0,004	23
0,008	5

- [144] *I. Ugi u. U. Fetzner*, *Angew. Chem.* 73, 621 (1961).  
 [145] *H. Gibian u. K. Lübke*, *Angew. Chem.* 72, 523 (1960).  
 [146] *M. M. Schemjakin*, *Angew. Chem.* 72, 342 (1960).  
 [147] *M. M. Schemjakin* u. Mitarbeiter, *Ber. Akad. Wiss. UdSSR (russ.)* 140, 387 (1961); *Chem. Abstr.* 56, 536 (1962).  
 [148] *R. Schwyzer u. J. P. Carrión*, *Helv. chim. Acta* 43, 2101 (1960).  
 [149] *H. Gibian u. K. Lübke*, *Liebigs Ann. Chem.* 644, 130 (1961).  
 [150] *W. Ried u. W. von der Emden*, *Angew. Chem.* 72, 268 (1960); *Liebigs Ann. Chem.* 642, 128 (1961).  
 [151] *W. Ried, W. Stephan u. W. von der Emden*, *Chem. Ber.* 95, 728 (1962).  
 [152] *M. Rothe, H. Brünig u. G. Eppert*, *J. prakt. Chem.* 280, 323 (1959).

Die hier als optimal erkannte Konzentration von 1 mMol pro Liter wird auch von den meisten Bearbeitern ähnlicher Probleme angewendet. Alle in der Peptidchemie bekannten Verknüpfungsmethoden können im Prinzip zur Cyclisierung dienen. Von den aktivierten Estern sind Thiophenylester [75], Cyanmethyl-, p-Nitrophenyl- [153], Carboxythiomethyl- und die oben erwähnten p-Methylsulfonylphenyl-ester [99] angewendet worden. Der bei ihrer Synthese notwendige Schutz der Aminogruppe muß so beschaffen sein, daß die Freisetzung ohne Angriff auf die aktivierende Gruppe möglich ist [99]. Ringschlüsse ohne Schutz der Aminogruppe und ohne spezielle Aktivierung der Carboxylgruppe werden mit Dicyclohexyl-carbodiimid [154] oder Äthoxyacetylen [155] erreicht. Das Diimid in mehrhundertfachem Überschuß erlaubte die Darstellung der vier möglichen Polymyxine aus entsprechend vorbereiteten Decapeptiden [156]. Bei Anwesenheit stark raumerfüllender Substituenten (Tosylgruppe) in der Nähe der Verknüpfungsstelle gelang der Ringschluß nicht [157].

Bei der verdoppelnden Cyclisierung von DL-Phenylalanyl-glycyl-glycin-p-nitrophenylester [99] findet interessanterweise eine Auswahl der Reaktionspartner statt. *Schwyzer* und *Tun Kyi* [158] synthetisierten die authentischen stereoisomeren Cyclohexapeptide (L,L; D,D; D,L) nach der Azidmethode und fanden, daß bei der Verdoppelung ausschließlich die Mesoverbindung (D,L) entstanden war. Es haben sich also nur L-Tripeptidmoleküle mit D-Tripeptidmolekülen zum Sechsring verbunden.

### Racemisierung bei der Peptidverknüpfung

Während freie Aminosäuren gegen racemisierende Einflüsse sehr widerstandsfähig sind, kann man an manchen Derivaten eine gewisse Labilität beobachten. Aminosäureester oder N-Acylaminosäuren werden leicht durch Basen racemisiert [159]. Man hat im Prinzip drei Racemisierungsmöglichkeiten zu unterscheiden:

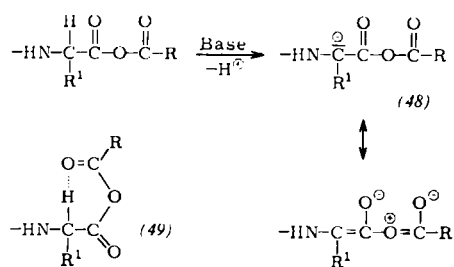
1. Racemisierung von Aminosäuren im Peptidverband
2. Racemisierung von Aminosäureanhydriden
3. Racemisierung aktivierter Acylaminosäuren infolge Ringbildung.

Der Racemisierung im Peptidverband unterliegen besonders die Aminosäuren, welche in  $\beta$ -Stellung elektronenziehende Substituenten (O, S) tragen. Durch

- [153] *R. Schwyzer u. P. Sieber*, *Helv. chim. Acta* 41, 2186 (1958); *R. Schwyzer u. B. Gorup*, *Helv. chim. Acta* 41, 2199 (1958).  
 [154] *Th. Wieland u. K. W. Ohly*, *Liebigs Ann. Chem.* 605, 179 (1957).  
 [155] *E. A. Morozova u. S. M. Zhenodarova*, *J. allg. Chem. (russ.)* 31, 45 (1961); *Chem. Abstr.* 55, 27121 (1961).  
 [156] *K. Vogler, R. O. Studer, W. Lergier u. P. Lanz*, *Helv. chim. Acta* 43, 1751 (1960); *R. O. Studer, K. Vogler u. W. Lergier*, *Helv. chim. Acta* 44, 131 (1961); *K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier u. E. Böhm*, *Experientia* 17, 223 (1961).  
 [157] *R. O. Studer u. K. Vogler*, *Helv. chim. Acta* 45, 819 (1962).  
 [158] *R. Schwyzer u. A. Tun-Kyi*, *Helv. chim. Acta* 49, 859 (1962).  
 [159] *A. Neuburger*, *Advances Protein Chem.* 4, 297 (1948).

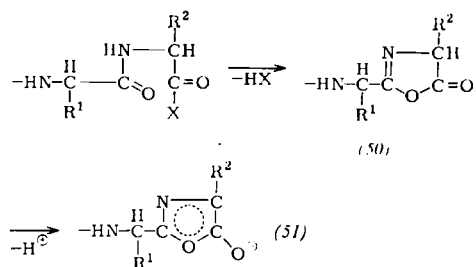
deren Wirkung wird die Bindung des  $\alpha$ -H-Atoms geschwächt. Als Beispiel aus der neueren Literatur sei die Beobachtung von McLaren [9] angeführt, daß Carbobenzoxo-glycyl-L-(S-benzyl)-cysteinäthylester beim alkalischen Verseifen weitgehend racemisiert, während die Säure unter den gleichen Bedingungen optisch aktiv bleibt. Das gleiche Peptid wird als tert.-Butylester bei der Behandlung mit Alkali vollkommen racemisiert unter Freisetzung der Carboxylgruppe [114]. Das Serinpeptid, Carbobenzoxo-L-seryl-L-alaninäthylester, lagert sich schon bei mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur in wäßrigem Triäthylamin in die diastereomeren D,L-Serinpeptide um [160], bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Die Labilität von Aminosäureanhydriden ist auf die elektronenanziehende Wirkung der zweiten Acylhälfte (48) und wohl auch auf die Möglichkeit der Lockerung des  $\alpha$ -H-Atoms durch eine Wasserstoffbrücke (49) zurückzuführen [159]. Auch hier kann eine Base das eigentlich auslösende Agens sein.



Wenn auch einige N-Acyliminosäuren, bei denen Azlactonbildung ausgeschlossen ist, als Anhydride racemisch werden [159], so läßt sich diese Art von Racemisierung bei der Peptidverknüpfung über Anhydride doch offenbar vermeiden, wenn der Anhydridzustand nur kurze Zeit und bei tiefer Temperatur auftritt. Bisher wurde keine Racemisierung von Carbobenzoxo-aminosäuren bei der Aktivierung beobachtet; möglicherweise fehlt aber hier ein genügend empfindlicher Test.

Weit rascher scheint die Racemisierung aktivierter Aminosäuren unter Ringbildung zu verlaufen. N-Acylierte Aminosäuren, zu denen auch die Peptide gehören,



können unter Wasserabspaltung zu Azlactonen (50) cyclisieren. In solchen Ringen ist die Abspaltung des Protons sehr erleichtert, weil sich ein aromatisches System (51) bildet. Bei den Carbobenzoxoaminosäuren tritt kein Ringschluß ein, so daß dieser Schutz der Aminogruppen nicht nur wegen der leichten Abspaltbarkeit

[160] E. Schnabel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 314, 114 (1959).

der Schutzgruppe den Vorzug verdient. Schon bei der Aktivierung eines Dipeptids aber wird fast bei jeder Verknüpfungsmethode (mit Ausnahme der über Azide) eine mehr oder weniger starke Racemisierung beobachtet.

Zur Ermittlung des Racemisierungsgrades dient das von Anderson [161] ausgearbeitete Verfahren. Carbobenzoxo-glycyl-L-phenylalanin wird mit Glycinäthylester gekuppelt und das entstandene Tripeptid aus 2-proz. Lösung in Äthanol fraktioniert kristallisiert. Dabei scheidet sich zuerst das DL-Peptid aus, das man an seinem höheren Schmelzpunkt erkennt. Bei einem weniger gebräuchlichen Racemisierungstest [162] wird die Trennbarkeit von Carbobenzoxo-glycyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-glycin und Carbobenzoxo-glycyl-D-phenylalanyl-L-alanyl-glycin (aus den Dipeptiden synthetisiert) durch Gegenstromextraktion ausgenutzt. Ein drittes Verfahren ist von Young und Mitarbeitern [163] auf mehrere Verknüpfungsmethoden unter sehr verschiedenen Bedingungen angewendet worden. Es besteht in der Kuppelung von Acetyl-L-leucin mit Glycinäthylester. Man erhält aber das racemische und das optisch reine Dipeptid nicht immer kristallin, so daß der Drehwert auch vor und nach der Hydrolyse gemessen werden muß, was häufig nur eine Abschätzung des Racemisierungsgrades erlaubt. Auf Untersuchungen desselben Autors an Peptiden des N-Benzoylleucins, die besser kristallisieren, sei hier nur verwiesen [163a]. Diese Peptide sind in Tabelle 2 nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse, welche bei der Prüfung der allgemein gebräuchlichen Methoden zur Peptidverknüpfung auf Racemisierung erhalten wurden, sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die angegebenen Werte wurden unter den für die Erhaltung der Konfiguration optimalen Bedingungen bestimmt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Azid-Methode die einzige ist, bei der die aktivierte Peptidkomponente nicht racemisiert. Tabelle 2 zeigt, daß es darüber hinaus keine Idealmethode zur Aktivierung zu geben scheint. Die Azidmethode hat ihren Mangel in der manchmal schlecht verlaufenden Hydrazinolyse von Polypeptidestern. Hier kann die oben geschilderte katalytische Beschleunigung durch Imidazol und die Verwendung etwas reaktionsfähigerer Ester weiterhelfen. Andererseits sollte die Racemisierungsgefahr bei den sehr rasch verlaufenden Kupplungen nicht überschätzt werden. Bei zügiger Ausführung einer Peptidsynthese nach der Anhydridmethode mit Chlorameisensäureäthylester bei tiefer Temperatur kann in guter Ausbeute reines L-Peptid gewonnen werden, auch wenn ein Dipeptid aktiviert wird. Ein relativ sicherer, wenn auch mühsamer Weg ist das fortgesetzte Anstückeln von Carbobenzoxo-aminosäuren, die bekanntlich wegen mangelnder Azlactonisierung schwer racemisieren.

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

[162] D. W. Clayton, J. A. Farrington, G. W. Kenner u. J. M. Turner, J. chem. Soc. (London) 1957, 1398.

[163] N. A. Smart, G. T. Young u. M. W. Williams, J. chem. Soc. (London) 1960, 3902.

[163a] M. W. Williams u. G. T. Young, J. chem. Soc. (London) 1963, 881.

Tabelle 2. Racemisierung bei der Peptidsynthese

Methode der Peptidverknüpfung	Lit.	Racemisierungstest oder synthetisiertes Peptid	Ergebnis
Gemischtes Anhydrid (Kohlensäurederivate) [a]	[164]	Anderson-Test [161] Young-Test [163]	2 % DL; 77 % L. 46 % DL; 54 % L.
Tetraäthylpyrophosphit	[165]	Anderson-Test Young-Test	0 % DL; 74 % L. [b] 78 % L. [b]
Dicyclohexylcarbodiimid	[84] [166]	Anderson-Test Young-Test Anderson-Test	87 % L. [c] 74 % L. [c] 7 % DL; 75 % L. [c]
Carbonyldiimidazol	[48, 117]	Anderson-Test	0,5 % DL; 87 % L.
Nitrophenylester	[168, 169]	Bei der Veresterung von Dipeptiden nach der Sulfit-[168] und Carbodiimid-Methode [169] erhebliche Racemisierung [d]	
p-Nitrothiophenylester	[170]	Z-Gly-L-Ala/L-Phe-Gly-OH [e]	24 % DL; 56 % L.
Schwefeltrioxyd	[162]	Z-Gly-L-Ala/L-Phe-Gly-OH [e]	0 % DL [f]
Äthoxyacetylen	[171]	Anderson-Test	0 % DL; 70 % L. [g]
Phosphorazo-Methode	[172] [173]	Z-Gly-L-Phe/L-Ala [e] N-Acyl-N(ε)-Z-Lys [e]	15 % DL; 80 % L. behält bei der Kupplung den vollen Drehwert [h]
Phosphorpentoxyd [i]	[174] [112]	Z-Gly-L-Leu/Gly-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> [e] Anderson-Test	63 % L. 32 % DL; 32 % L.
Isoxazolium-Methode	[90]	Anderson-Test	2,2 % DL; 90 % L.
N-Hydroxyphthalimid	[105]	[k]	nicht entschieden
Hydrazid-Oxydation	[80]	Anderson-Test	1,1 % DL; 63 % L.
Phosgen/Dimethylformamid	[69]		weitgehende Racemisierung

[a] Mit Chloroform als Lösungsmittel oder bei höheren Temperaturen während der Anhydrid-Bildung ist der racemische Anteil wesentlich größer.

[b] Dieses Ergebnis wird nach dem „Standard“- und nach dem „Amid“-Verfahren in Abwesenheit quartärer Salze erhalten. Namentlich bei höheren Temperaturen tritt beim „Anhydrid“-Verfahren erhebliche Racemisierung ein.

[c] Die Diskrepanz läßt sich aus der Tatsache erklären, daß *Sheehan* und *Hess* [84] nicht das Kristallisationsverfahren anwendeten, das bei *Anderson* und Mitarbeitern [161, 165, 166] zur Entdeckung kleiner Mengen von Racemat führt. Ein weiterer wertvoller Beitrag zu dieser Frage ist die Synthese des Tetrapeptids Carbobenzoxymitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucinmethylester [167] auf allen möglichen Kupplungswegen. Immer, wenn das Carbobenzoxy-di- oder -tripeptid über das Anhydrid oder mit Carbodiimid gekuppelt wurde, erhielt man wesentlich geringere Ausbeuten und unreine Produkte, die sich auch enzymatisch nicht völlig spalten ließen.

[d] Die Racemisierung scheint stark von der Art der Aminosäurereste abzuhängen. So konnte Carbobenzoxy-L-(S-benzyl)-cysteinyl-L-tyrosin nach der Sulfitmethode glatt und ohne Racemisierung verestert werden, während Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin nur eine geringe Ausbeute unter erheblicher Racemisierung auch der nicht umgesetzten Säure ergab [168].

[e] Z = Carbobenzoxymethyl.

[f] Vor allem bei etwas höherem pH-Wert als dem hier angewendeten (6,5) ist die Racemisierung wesentlich stärker.

[g] Die Anwesenheit von Triäthylammoniumhydrochlorid ergibt bei sonst gleichen Bedingungen einen großen Anteil racemisches Produkt.

[h] Die Diskrepanz der beiden Ergebnisse ist nicht besonders schwerwiegend, weil die Resultate von *Goldschmidt* und *Rosculiet* [173] nur auf Drehwertmessungen beruhen. Dabei ist es zweifelhaft, ob nicht geringe Mengen von Racemat vorher durch Kristallisation abgetrennt worden sind oder sich im Ergebnis der Messung nicht bemerkbar machen. Der Vergleich zweier Tripeptide, dargestellt aus Acyl-dipeptid und Aminosäureester sowie aus Acyl-aminosäure und Dipeptidester, ist nicht stichhaltig, da in den kritischen Fällen am Glycin verknüpft wurde.

[i] Der Test von *Schramm* und *Wissmann* [174] beruht auf der Hydrolyse des kristallisierten Tripeptids mit anschließender Messung des Drehwertes im Vergleich zu einer authentischen Aminosäure-Mischung. *Erlanger* und *Kokowsky* [112] konnten keine Verringerung des racemischen Anteils bei Variation der Kupplungsbedingungen erreichen.

[k] Der angeführte [105] „Anderson-Test“ trifft nicht das Richtige, da das Tripeptid aus Carbobenzoxymethylglycinäthylester und L-Phenylalanyl-glycinäthylester hergestellt wurde, wobei eine Racemisierung natürlich unmöglich ist.

Sonst bleibt die Möglichkeit, Peptide mit carboxylendständigem Glycin oder Prolin zu verwenden. Es gibt Anzeichen dafür, daß nicht alle L-Aminosäuren gleich stark racemisieren, so daß sich die Auswahl an racemisierungs-sicheren Oligopeptiden, die man mit zweiten in einfacher Weise kuppeln kann, noch ver-

mehren dürfte. Hier muß noch viel systematische Arbeit geleistet werden. Garantiert ohne Racemisierung des Carboxylendes verläuft die enzymatische Kupplung [175], auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

Eingegangen am 3. Oktober 1962 [A 274]

[164] J. R. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. 74, 6137 (1952).

[165] G. W. Anderson, J. Blodinger u. A. D. Welcher, J. Amer. chem. Soc. 74, 5309 (1952).

[166] G. W. Anderson u. F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 80, 2902 (1958).

[167] H. Schwarz u. F. M. Bumpus, J. Amer. chem. Soc. 81, 890 (1959).

[168] B. Iselin u. R. Schwyzer, Helv. chim. Acta 43, 1760 (1960).

[169] K. Lübke u. E. Schröder, Z. Naturforsch. 16b, 765 (1961).

[170] J. A. Farrington, P. J. Hextall, G. W. Kenner u. J. M. Turner, J. chem. Soc. (London) 1957, 1407.

[171] H. J. Pannemann, A. F. Marx u. J. F. Arens, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 78, 487 (1959).

[172] W. Grassmann, E. Wunsch u. A. Riedel, Chem. Ber. 91, 455 (1958).

[173] St. Goldschmidt u. G. Rosculiet, Chem. Ber. 93, 2387 (1960).

[174] G. Schramm u. H. Wissmann, Chem. Ber. 91, 1073 (1958).

[175] Vgl. H. Determann, O. Zipp u. Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 651, 172 (1962).