

BURCKHARDT HELFERICH und HORST BÖSHAGEN¹⁾

Synthese einiger Peptide aus Histidin, Valin und Leucin

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 30. Mai 1959)

Ausgehend von einigen z. T. neuen Acyl-Derivaten des Histidins wurden die Dipeptide Histidyl-valin und Histidyl-leucin, das Tripeptid Histidyl-valyl-leucin und eine Anzahl Derivate dieser Peptide sowie von Leucyl-valin, Histidyl-leucyl-valin und Histidyl-glycin synthetisiert. Als Nebenprodukte wurden einige N-substituierte *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoffe erhalten.

H. GAREIS²⁾ konnte bei der Untersuchung der sauren Kartoffel-Phosphatase feststellen, daß aus diesem Ferment durch Dialyse sich in kleinen Mengen Valin, Leucin und Histidin abtrennen lassen. Das durch diese Dialyse in seiner Wirksamkeit geschädigte Ferment kann durch „Kochsaft“ des Ferments zu einem erheblichen Teil reaktiviert werden.

Um zu prüfen, ob Peptide aus Histidin, Valin und Leucin diese Reaktivierung des dialysegeschädigten Ferments bewirken, sind in der vorliegenden Arbeit Histidyl-valin, Histidyl-leucin³⁾ und Histidyl-leucyl-valin synthetisch hergestellt worden.

Der Zusatz dieser Peptide zu der dialysegeschädigten sauren Kartoffel-Phosphatase hat keine Reaktivierung bewirkt.

Immerhin wird im folgenden die Darstellung der oben angegebenen, z. T. neuen Oligopeptide beschrieben, zumal bei den Synthesen eine Reihe von ebenfalls neuen Zwischen- und Nebenprodukten hergestellt und durch Abänderung bekannter Methoden einige Fortschritte erzielt wurden, die auch für die Synthese anderer Peptide von Wert sein können.

Die Erhaltung der sterischen Konfiguration bei der Synthese der Oligopeptide wurde zunächst nur in beschränktem Umfang erreicht.

Als Amino-Schutzgruppen dienten bei den Synthesen vorwiegend Phthalyl- bzw. *o*-Carboxybenzoyl-, in geringerem Umfange Carbobenzoxy- und Tosyl-Rest; die Carboxylgruppen wurden durch Veresterung mit Äthanol oder Benzylalkohol geschützt. Zur Peptid-Kondensation wurden Phosphorazo-⁴⁾, Carbodiimid-⁵⁾ und Azid-Methode³⁾ benutzt. Die optische Reinheit der synthetisch hergestellten Substanzen ist nicht nachgeprüft worden. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die neuen Substanzen optisch nicht einheitlich sind, auch dann, wenn optisch aktives Ausgangsmaterial eingesetzt wurde.

¹⁾ H. BÖSHAGEN, Dissertat. Univ. Bonn 1958.

²⁾ H. GAREIS, Dissertat. Univ. Bonn 1955.

³⁾ R. W. HOLLEY und E. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. 76, 1326 [1954].

⁴⁾ St. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER, Liebigs Ann. Chem. 580, 68 [1953]; und spätere Veröffentlichungen von St. GOLDSCHMIDT und Mitarbb.

⁵⁾ J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 [1955]; H. G. KHORANA, Chem. and Ind. 1955, 1087.

Für die Synthese von Phthalyl-L-histidin wurden die Erfahrungen bei der Phthalylierung der L-Glutaminsäure⁶⁾ nutzbar gemacht: L-Histidin-methylester⁷⁾ wurde in Chloroform durch Phthalsäure-anhydrid acyliert zu o-Carboxybenzoyl-L-histidin-methylester. Da dessen Behandlung mit Thionylchlorid racemischen Phthalyl-histidin-methylester ergab, wurde zunächst die Estergruppe vorsichtig mit Barytwasser verseift und dann erst der Phthalimid-Ring durch langes Erwärmen über Diphosphor-pentoxyd im Vakuum bei 110° unter Wasserabspaltung geschlossen, wobei die optische Aktivität des Histidins vollständig erhalten blieb. Entsprechende Behandlung führte auch bei o-Carboxybenzoyl-peptiden, die bei alkalischer Verseifung von Phthalyl-peptid-estern vielfach erhalten werden (vgl. I.c.⁸⁾), zum gleichen Erfolg, worauf sich der Phthalyl-Rest in der üblichen Weise mit Hydrazin-hydrat abspalten ließ.

Die Gewinnung von Tosyl-L-histidin⁹⁾ gelang mit weit größerer Ausbeute als bisher durch N,N'-Ditosylierung von L-Histidin-methylester⁷⁾ und anschließende alkalische Verseifung unter Wiederabspaltung des einen Tosyl-Restes.

Tab. 1. Acyl-dipeptid-ester

Nr.	Verbindung	Ausgangsmaterialien	Methode	Krist.	Ausb. %
I	Pht-His-Val-Et	Pht-DL-His ¹¹⁾ + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	PN	+	62
	Pht-His-Val-Et	Pht-DL-His·HCl + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	CD	+	50
II	Pht-His-Val-Bz	Pht-DL-His ¹¹⁾ + DL-Val-Bz·HCl	PN	+	75
III	o-CB-His-Val-Bz	II Behandlung mit Pyridin in währ. EtOH	-		85
IV	Tos-His-Val-Et	Tos-L-His·H ₂ O + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	PN	+	76
V	Cbo-L-His-Val-Et	Cbo-L-His-NHNH ₂ ³⁾ + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	N ₃	--	80
VI	o-CB-DL-His-Gly-Et	Pht-L-His·HCl + Gly-Et·HCl	CD	+	72
VII	Pht-His-Leu-Et	Pht-DL-His ¹¹⁾ + L-Leu-Et·HCl ^{13, 14)}	PN	+	80
VIII	o-CB-L-His-L-Leu-Et	Pht-L-His·HCl + L-Leu-Et·HCl ^{13, 14)}	CD	+	79
IX	o-CB-His-Leu-Bz	Pht-DL-His ¹¹⁾ + L-Leu-Bz·HCl ¹⁰⁾	PN	+	77
X	Cbo-L-His-L-Leu-Et	Cbo-L-His-NHNH ₂ ³⁾ + L-Leu-Et·HCl ^{13, 14)}	N ₃	--	81
XI	Pht-Leu-Val-Et	Pht-L-Leu ⁸⁾ + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	PN	--	81
	Pht-Leu-Val-Et	Pht-L-Leu ⁸⁾ + DL-Val-Et·HCl ¹²⁾	CD	--	90

Abkürzungen (auch f. d. folgenden Tabellen): Pht: Phthalyl; o-CB: o-Carboxybenzoyl; Tos: p-Toluolsulfonyl (Tosyl); Cbo: Carbobenzoxy; Et: Äthyl(ester); Bz: Benzyl(ester); PN: Phosphorazo-Kondensation; CD: Carbodiimid-Kondensation; N₃: Azid-Kondensation; EtOH: Äthanol; Krist.: Kristallisation.

⁶⁾ F. E. KING und D. A. A. KIDD, J. chem. Soc. [London] 1949, 3315.

⁷⁾ H. PAULY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 42, 514 [1904]; E. FISCHER und L. H. CONE, Liebigs Ann. Chem. 363, 108 [1908].

⁸⁾ L. REESE, Liebigs Ann. Chem. 242, 6 [1887]; S. GABRIEL und K. KROSENBERG, Ber. dtsch. chem. Ges. 22, 427 [1889].

⁹⁾ E. W. McCHESSNEY und K. SWANN JR., J. Amer. chem. Soc. 59, 1117 [1937].

Als neues Aminosäure-Derivat wurde ferner DL-Valin-benzylester-hydrochlorid dargestellt (vgl. I. c.¹⁰).

Aus den oben angeführten und weiteren, nach Literaturvorschriften hergestellten Aminosäure-Derivaten wurden eine Anzahl Acyl-dipeptid-ester (Tab. 1) nach den angegebenen Methoden synthetisiert.

Aus diesen entstanden durch teilweise oder vollständige Schutzgruppen-Abspaltung die in Tab. 2 zusammengestellten Acyl-dipeptide und Dipeptide.

Tab. 2. Acyl-dipeptide und freie Dipeptide

Nr.	Verbindung	Ausgangsmaterial	Methode	Krist.	Ausb. %
XII	<i>o</i> -CB-His-Val	I	Alkal. Verseif.	+	90
XIII	Pht-His-Val	II	Katalyt. Hydrier.	+	51
	Pht-His-Val	XII	Erhitzen i. Vak.	+	65
	Pht-His-Val·HCl	I	Saure Verseif.	+	31
XIV	Tos-His-Val	IV	Alkal. Verseif.	+	66
XV	Cbo-L-His-Val	V	Alkal. Verseif.	+	65
XVI	Cbo-L-His-L-Leu ³⁾	X	Alkal. Verseif.	+	65
XVII	Pht-Leu-Val	XI	Saure Verseif.	+	43
XVIII	<i>o</i> -CB-Leu-Val	XI	Alkal. Verseif.	+	70
XIX	L-His-Val	XV	Katalyt. Hydrier.	+	46

Kondensation einiger der Acyl-dipeptide mit Aminosäure-estern ergab Acyl-tripeptid-ester, welche zusammen mit den durch Schutzgruppen-Abspaltung erhaltenen Folgeprodukten in Tab. 3 aufgeführt sind.

Tab. 3. Tripeptide und -Derivate

Nr.	Verbindung	Ausgangsmaterial	Methode	Krist.	Ausb. %
XX	Cbo-L-His-Val-L-Leu-Et	XV + L-Leu-Et·HCl ^[13, 14]	CD	—	85
XXI	Cbo-L-His-Val-L-Leu	XX	Alkal. Verseif.	?	83
XXII	L-His-Val-L-Leu	XXI	Katalyt. Hydrier.	+	50
	L-His-Val-L-Leu	XXI	HCl-Solvolyse	+	54
XXIII	Tos-His-Val-Leu-Et	XIV + L-Leu-Et·HCl ^[13, 14]	PN	?	47
XXIV	Tos-His-Val-Leu	XXIII	Alkal. Verseif.	+	98
XXV	Cbo-L-His-Leu-Val-Et	XVI + DL-Val-Et·HCl ^[12]	CD	—	95
XXVI	Cbo-L-His-Leu-Val·HCl	XXV	Alkal. Verseif.	+	87

Bei Ausführung der Carbodiimid-Kondensationen bei Raumtemperatur ohne besondere Kühlung entstanden neben den gewünschten Peptid-Derivaten durch Um-

¹⁰⁾ H. K. MILLER und H. WAEISCH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1093 [1952].

¹¹⁾ a) W. KEIL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **208**, 70 [1932]. b) G. WANAG und A. VEINBERGS, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1568 [1942]. c) R. F. FISCHER und R. R. WHETSTONE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5080 [1954].

¹²⁾ TH. CURTIUS und A. BENCKISER (1923), J. prakt. Chem. [2] **125**, 254 [1930]; J. D. BILLIMORIA und A. H. COOK, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2323; dargestellt analog anderen Aminosäure-äthylester-hydrochloriden nach E. FISCHER (vgl. I. c.¹³), schmilzt das Salz bei 107 – 109° (Lit.: 76° und 73 – 76°).

¹³⁾ E. FISCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. **34**, 445 [1901].

¹⁴⁾ F. RÖHMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **30**, 1980 [1897].

lagerung in beträchtlicher Menge *N*-substituierte *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoffe (vgl. 5, 15)). Zwei Vertreter davon, die rein isoliert und identifiziert wurden, sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4. *N*-Substituierte *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoffe

Nr.	Substituent	Ausgangsmaterial	Krist.	Ausb. %
XXVII	Pht-L-Leu	wie XI	+	16
XXVIII	Cbo-L-His-Leu	wie XXV	+	18

Erfolgte die Kondensation bei genügend tiefer Temperatur, so unterblieb ihre Bildung praktisch vollständig.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für die Unterstützung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Außerdem danken wir Herrn Dr. JOHANNES ULLRICH sehr herzlich für seine Hilfe bei der Zusammenstellung und der Prüfung der Ergebnisse.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE*)

Derivate von Aminosäuren

1. *Phthalyl-DL-histidin*¹¹⁾: 4.0 g (19 mMol) *L-Histidin·HCl·H₂O*, 4.0 g (27 mMol) *Phthalsäure-anhydrid* und 2.0 g wasserfreies Na-Aacetat werden fein miteinander verrieben. Nach Zugabe von 25 ccm Dimethylformamid wird die Mischung unter starkem Rühren rasch zum Sieden erhitzt und 1 Stde. rückgekocht. Die nach 20–30 Min. einsetzende Kristallisation des *Phthalyl-DL-histidins* wird über Nacht im Kühlschrank vollständig. Das abgesaugte und mit Äthanol gewaschene Rohprodukt (7 g) wird aus 200 ccm Wasser unter Behandlung mit Aktivkohle umkristallisiert. Ausb. 4.0 g (74% d. Th.) kurze, derbe Prismen vom Schmp. 296.5° (Zers.) [Lit.: 188°^{11a}), 296° (Zers.)^{11b} und 294–296°^{11c}]. Leichtlöslich in verd. Säuren und Laugen, löslich in heißem Wasser, schwerlöslich in kaltem Wasser, Pyridin und Dimethylformamid. Die Lösungen drehen die Polarisationsebene nicht.

Hydrochlorid: Die Lösung von 285 mg (1 mMol) Phthalyl-DL-histidin in 1.0 ccm *n HCl* wird i. Vak. über KOH zu einer glasigen Masse eingedunstet, die beim Anreiben mit einigen Tropfen Äthanol kristallisiert und aus 3 ccm Äthanol durch Zugabe von 6 ccm Äther umkristallisiert wird. Ausb. 290 mg (90% d. Th.) lange Nadelchen vom Schmp. 153–155°. Leichtlöslich in Wasser, Alkoholen, Pyridin, Dimethylformamid, Dioxan und Tetrahydrofuran, schwerlöslich in Äther.

C14H11N3O4·HCl·H2O (339.7) Ber. C 49.49 H 4.15 N 12.37
Gef. C 50.53 H 4.22 N 12.39

2. *o-Carboxybenzoyl-L-histidin-methylester*: 3.6 g (15 mMol) *L-Histidin-methylester·2 HCl*¹⁷⁾ werden in 25 ccm absol. Chloroform, das bei 0° mit Ammoniak gesättigt ist, 30 Min. geschüttelt. Das Filtrat vom unlöslichen Ammoniumchlorid wird i. Vak. eingedampft, der erhaltene Sirup in 5 ccm Chloroform gelöst, erneut eingedampft und diese letztere Operation wiederholt. Der meist sirupös erhaltene freie Ester wird in 20 ccm absol. Chloroform gelöst und die Lösung bei 0° unter Röhren langsam mit 2.2 g (15 mMol) gepulvertem *Phthalsäure-anhydrid* versetzt. Beim Weiterröhren bei Raumtemperatur kristallisiert nach einigen Min. der *o-Carboxybenzoyl-L-histidin-methylester* aus; er wird abgesaugt, mit Chloroform ge-

¹⁵⁾ R. B. MERRIFIELD und D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4646 [1956].

¹⁷⁾ Die Schmpp. (unkorr.) sind auf dem Cu-Block unter dem Mikroskop bestimmt.

waschen und aus 80–100 ccm Methanol durch Zusatz von 250–300 ccm Äther umkristallisiert. Ausb. 3.9 g (81% d. Th.) kleine, sechsseitige Plättchen vom Schmp. 138–140°. Leichtlöslich in Wasser, löslich in Alkoholen, Pyridin, Dimethylformamid, schwerlöslich in Chloroform, unlöslich in Dioxan, Äther und Petroläther.

$C_{15}H_{15}N_3O_5$ (317.3) Ber. C 56.78 H 4.76 N 13.24 Gef. C 56.88 H 4.73 N 13.33

$[\alpha]_D^{25}$: -30.0° (c = 5.16, in 0.25n HCl).

3. *Phthalyl-DL-histidin-methylester · HCl* [11a,c]: 4.5 g (14 mMol) *o-Carboxybenzoyl-L-histidin-methylester* (2.) bleiben nach Vermischen mit 12 ccm *Thionylchlorid* unter Wasserausschluß 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach Vertreiben des überschüssigen Thionylchlorids i. Vak. bei höchstens 35° Badtemperatur kristallisiert der Rückstand beim Anreiben mit 10 ccm Äthanol. Vakuumedampfen des Breies und Anreiben werden wiederholt, dann das Produkt abgesaugt. Ausb. 3.2 g (67% d. Th.). Die Substanz kristallisiert analysenrein aus Äthanol oder Isopropylalkohol in kurzen, schiefen, sechskantigen Prismen vom Schmp. 196–200° (Cu-Block) bzw. 205.5° (verschl. Kapillare) [Lit.: 238–240°^{11a}] und 221–223° (Kapillare) bzw. 209–211° (Al-Block)^{11c}]. Leichtlöslich in Wasser, Methanol, Pyridin, Dimethylformamid, löslich in Äthanol und Isopropylalkohol, unlöslich in Äther.

$C_{15}H_{13}N_3O_4 \cdot HCl$ (335.7) Ber. N 12.52 Gef. N 12.62

4. *o-Carboxybenzoyl-L-histidin*: 2.7 g (8.55 mMol) *o-Carboxybenzoyl-L-histidin-methylester* (2.) werden bei Raumtemperatur unter Rühren in 70 ccm 0.313n Barytwasser (21.9mVal) gelöst. Die nach 45 Min. mit 43.8 ccm 0.5n H_2SO_4 neutralisierte (p_H 3.6–3.8) Suspension wird im siedenden Wasserbad kurz auf 80–90° erhitzt und durch ein hartes Filter filtriert. Aus dem i. Vak. auf 30 ccm eingeengten Filtrat kristallisieren im Laufe einer Stde. 0.2 g Phthalyl-L-histidin (5.), die abfiltriert werden. Völliges Eindampfen der Mutterlauge i. Vak. ergibt 2.3 g (89% d. Th.) rohes, sirupöses *o-Carboxybenzoyl-L-histidin*, das zur Weiterverarbeitung auf Phthalyl-L-histidin (5.) geeignet ist.

In kristallisierter Form wird die Verbindung durch vorsichtige Hydrolyse von Phthalyl-L-histidin (5.) erhalten: 200 mg (0.7 mMol) Phthalyl-L-histidin (5.) werden in 1.00 ccm n NaOH gelöst. Beim Neutralisieren mit 1.00 ccm n HCl sofort ausfallendes Ausgangsmaterial (30mg) wird abfiltriert und die Lösung im Exsikkator eingedunstet. Im Laufe einiger Tage kristallisieren 120 mg (57% d. Th.) *o-Carboxybenzoyl-L-histidin* in langen, derben Prismen vom Schmp. 277–283° (bei 200° zerfallen die Kristalle in ein feines Pulver). Löslich in verd. Laugen, schwerlöslich in Wasser, Pyridin, Dimethylformamid, unlöslich in Äthanol.

$C_{14}H_{13}N_3O_5$ (303.3) Ber. C 55.44 H 4.32 N 13.85 Gef. C 55.67 H 4.34 N 13.84

$[\alpha]_D^{25}$: +56.3° (c = 1.92, in 0.25n NaOH).

o-Carboxybenzoyl-DL-histidin entsteht in gleicher Weise aus Phthalyl-DL-histidin (1.). Es kristallisiert wesentlich leichter als die L-Verbindung in dünnen, teilweise zu knolligen Drusen vereinigten Prismen vom Schmp. 193–195° (Umwandlungspunkt 182–185°).

5. *Phthalyl-L-histidin*: 2.3 g (7.6 mMol) rohes *o-Carboxybenzoyl-L-histidin* (4.) werden 72 Stdn. bei 110° i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Beim Behandeln der entstandenen spröden Masse mit 10 ccm Wasser setzt sofort die Kristallisation ein. Nach 24 Stdn. wird die Substanz abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Wasser unter Behandlung mit Aktivkohle umkristallisiert. Ausb. 1.8 g (83% d. Th.) derbe, sechseckige Kristalle vom Schmp. 280 bis 283° (Zers.). Leichtlöslich in verd. Säuren und Laugen, löslich in Wasser, schwerlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, unlöslich in Alkoholen.

$C_{14}H_{11}N_3O_4$ (285.3) Ber. N 14.73 Gef. N 14.75

$[\alpha]_D^{25}$: -111.8° (c = 5.22, in n HCl).

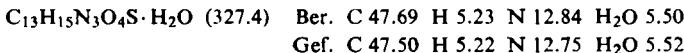
Hydrochlorid: Darstellung und Eigenschaften wie beim Phthalyl-DL-histidin-HCl (1.). Kristallisation durch langsames, u. U. wiederholtes Eindunsten der äthanolischen Lösung im Exsikkator über CaCl_2 .

6. *N,N'-Ditosyl-L-histidin-methylester*: 3.0 g (12.5 mMol) *L-Histidin-methylester·2HCl*⁷⁾ werden in 50 ccm absol. Chloroform unter Röhren und Eiskühlung mit 6.9 ccm Triäthylamin versetzt. Nach 15 Min. werden in die Suspension 4.8 g (25.3 mMol) *p-Toluolsulfonchlorid* so langsam eingetragen, daß die Temperatur 15° nicht übersteigt. Es tritt bald völlige Auflösung ein. Beim Weiterröhren ohne Kühlung kristallisiert der tosylierte Ester nach ca. 20 Min. aus. Er wird nach einigen Stdn. abgesaugt und gut mit Chloroform gewaschen. Aus dem Filtrat fällt auf Zusatz des gleichen Volumens Äther weiteres, stark verunreinigtes Produkt, das zur Entfernung von Tosylchlorid und Triäthylamin-HCl nacheinander mit Äther und mit Wasser gut durchgewaschen wird. Ausb. (zusammen) 5.6 g (94% d. Th.) Rohprodukt, das aus ca. 100 ccm Aceton auf Zugabe von 100 ccm Wasser analysenrein kristallisiert in quadratischen Plättchen (4.5 g, 75% d. Th.) vom Schmp. 188–190°; leichtlöslich in Aceton, Eisessig, Acetanhydrid, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Chloroform, Tetrahydrofuran, Dioxan und Methyläthylketon, schwerlöslich in Alkoholen und Benzol, unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther.



$[\alpha]_D^{22} : +5.7^\circ$ ($c = 1.23$, in Dioxan). Die Lösung in Eisessig zeigt keine meßbare Drehung.

7. *Tosyl-L-histidin*⁹⁾: Eine Suspension von 4.77 g (10 mMol) *Ditosyl-L-histidin-methylester* (6.) in 30 ccm n NaOH wird 30 Min. bei 60° gerührt und die von etwa vorhandenen Rückständen abfiltrierte klare Lösung nach raschem Abkühlen mit 20 ccm n HCl neutralisiert. Beim Reiben kristallisiert *Tosyl-L-histidin* als Monohydrat schlagartig aus. Es wird nach kurzem Stehenlassen abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 2.85 g (87% d. Th.) derbe, blätterförmige Kristalle, die nach Umkristallisieren aus der ca. 50fachen Menge Wasser bei 205–208° schmelzen (Lit.⁹⁾: 202–204°. Leichtlöslich in verd. Säuren und Laugen, löslich in Wasser, Pyridin und Dimethylformamid. Die Substanz gibt ihr Kristallwasser nur sehr schwer ab.



$[\alpha]_D^{22} : -32.2^\circ$ ($c = 3.58$, in n HCl).

p-Toluolsulfonat: 477 mg (1 mMol) *Ditosyl-L-histidin-methylester* (6.) werden mit 4.0 ccm n NaOH wie vorstehend behandelt und die mit 4.0 ccm n HCl neutralisierte Lösung i. Vak. auf 3 ccm eingedampft. Das beim Erkalten auskristallisierte Salz wird mit wenig Eiswasser gewaschen. Ausb. 300 mg (62% d. Th.) leichte, glänzende Blättchen vom Schmp. 194–196°. Leichtlöslich in Wasser, Alkoholen und Pyridin, unlöslich in Aceton, Äther, Chloroform.

8. *Tosyl-DL-histidin*: Die Lösung von 180 mg *Tosyl-L-histidin-p-toluolsulfonat* (7.) in 1.5 ccm Pyridin wird 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und mit 30 ccm Chloroform verdünnt. Im Kühlschrank kristallisieren 100 mg (68% d. Th.) *Tosyl-DL-histidin* vom Schmp. 236.5–238°.



9. *D,L-Valin-benzylester·HCl*: Eine Mischung von 3.9 g (33 mMol) *D,L-Valin*, 5.8 g (37 mMol) Benzolsulfinsäure und 16.7 ccm Benzylalkohol wird 2 Stdn. bei 10–12 Torr auf 115–120° erhitzt. Beim anschließenden Abdestillieren von ca. 10 ccm Benzylalkohol bei 0.1 Torr und 85° wird ein Öl erhalten, das beim Behandeln mit 200 ccm Äther kristallisiert. Ausb. ca. 10 g gut zerkleinertes und gründlich mit Äther gewaschenes Rohprodukt, aus dem mit 2.5 g K_2CO_3 in 50 ccm Wasser der Ester freigesetzt und sofort mit drei 30-ccm-Por-

tionen Essigester extrahiert wird. Die Auszüge werden nach Trocknen mit Na_2SO_4 unterhalb von 40° i. Vak. auf 20 ccm eingeengt, mit 10 ccm einer bei 20° gesättigten HCl-Lösung in Äther versetzt und i. Vak. völlig eingedampft. Das Produkt kristallisiert beim Reiben oder Impfen und wird aus 30 ccm Essigester durch Zugabe von 50–60 ccm Petroläther umkristallisiert und dann mit Essigester/Petroläther (1:2) gewaschen. Ausb. 4.2 g (52% d. Th.) dünne Nadeln oder Blättchen vom Schmp. 97–99°. Leichtlöslich in Wasser, Chloroform und Pyridin, löslich in Essigester, Aceton und cyclischen Äthern, unlöslich in Äther und Paraffinkohlenwasserstoffen.



10. *L-Leucin-benzylester·HCl*¹⁰⁾: 4.36 g (33 mMol) *L-Leucin* werden verestert, wie beim *DL-Valin-benzylester·HCl* (9.) beschrieben. Das rohe, ölige Benzolsulfonat geht nach der Ätherzugabe ganz in Lösung und kristallisiert nach Reiben an der Glaswand im Kühlschrank in Nadeln (10 g) vom Schmp. 135–145°. Es wird ins Hydrochlorid umgewandelt, wie bei 9. beschrieben. Ausb. 5.1 g (60% d. Th.) verfilzte Nadelchen vom Schmp. 144.5° (Sublimation ab 125°) [Lit.¹⁰⁾: Schmp. 129°]. Zur Analyse werden 200 mg aus 2 ccm Essigester mit 5 ccm Petroläther umkristallisiert (erhalten 145 mg, Schmp. unverändert). Löslichkeit wie die von 9.

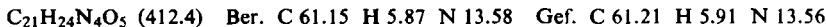


$[\alpha]_D^{26}$: -7.3° ($c = 5.85$, in 0.1*n* HCl) [Lit.¹⁰⁾: $[\alpha]_D$: -8° ($c = 2.00$, in 0.1*n* HCl)].

Histidyl-valin und -Derivate

11. Phthalyl-histidyl-valin-äthylester (I) (Gemisch zweier Racemate)

a) (*Phosphorazo-Methode*): In eine Lösung von 4.3 g (23.6 mMol) *DL-Valin-äthylester·HCl*¹²⁾ in 50 ccm völlig wasserfreiem Pyridin¹⁶⁾ lässt man unter Röhren bei -10° eine Mischung von 1.62 g (1.03 ccm; 11.8 mMol) PCl_3^+ und 20 ccm Pyridin¹⁶⁾ während 30 Min. eintropfen. Die Lösung wird noch 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt, mit 6.5 g (23.6 mMol) *Phthalyl-DL-histidin* (1.) versetzt und nach dessen Auflösung 6 Tage aufbewahrt. Der dann durch Eindampfen i. Vak. erhaltene Sirup wird in 100 ccm Wasser gelöst (p_{H} 5), die Lösung filtriert und tropfenweise mit *n* NaOH versetzt. Nachdem bei p_{H} 5.6 das Produkt auszufallen beginnt, werden dreimal 15 ccm *n* NaOH in einer Portion zugegeben und sogleich die entstandene Suspension mit 50 ccm Essigester ausgeschüttelt (p_{H} 6.7 darf dabei nicht überschritten werden). Die beim Vakuumeidampfen der mit Wasser gewaschenen und mit Na_2SO_4 getrockneten Esterauszüge erhaltene, manchmal bereits kristalline Masse wird aus 60 ccm Benzol, das 9 ccm Pyridin enthält, umkristallisiert. Ausb. 6.0 g (62% d. Th.) körnige Kristalle, die sich bei 112–113° umlagern und bei 162.5–165° schmelzen. Leichtlöslich in verd. Säuren und Laugen, niederen Alkoholen, Aceton, Chloroform, Pyridin, Essigester, Dioxan und Dimethylformamid, schwerlöslich in Äther, unlöslich in Wasser und Petroläther.



b) (*Carbodiimid-Methode*): Die Lösung von 482 mg (1.5 mMol) *Phthalyl-DL-histidin·HCl* (1.) und 280 mg (1.5 mMol) *DL-Valin-äthylester·HCl*¹²⁾ in 10 ccm trockenem Pyridin wird bei -8° mit 315 mg (1.5 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷⁾ versetzt und 2 Std. bei -8° , anschließend über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Filtrat vom Dicyclohexyl-harnstoff wird i. Vak. zum Sirup eingedampft, dessen filtrierte Lösung in 20 ccm Wasser wie oben weiterbehandelt wird. Ausb. 310 mg (50% d. Th.).

* Frisch gereinigt durch Destillation über *N,N*-Dimethyl-anilin.

¹⁶⁾ L. BILEK, J. DERKOSCH, H. MICHL und F. WESSELY, Mh. Chem. **84**, 727 [1953].

¹⁷⁾ E. SCHMIDT und Mitarb., Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1938 [1938]; Liebigs Ann. Chem. **571**, 83 [1951]; vgl. auch H. G. KHORANA, Chem. Reviews **53**, 145 [1953].

12. *Phthalyl-histidyl-valin-benzylester (II) (Gemisch zweier Racemate)*: 6.0 g (21 mMol) *Phthalyl-DL-histidin* (1.) und 5.15 g (21 mMol) *DL-Valin-benzylester-HCl* (9.) werden in 30 ccm Pyridin mit 0.92 ccm PCl_3 nach der Phosphorazo-Methode (11a) kondensiert. Die Lösung des Verdampfungsrückstandes in 50 ccm Chloroform wird mit 7.25 ccm Triäthylamin versetzt, dreimal mit 150 ccm Wasser ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingedampft zu einem langsam kristallisierenden Sirup (ca. 13 g). Umkristallisieren aus 30 ccm Chloroform durch Zusatz von 60–80 ccm Petroläther führt zu 7.5 g (75% d. Th.) feinen, oft aggregierten Prismen, die nach nochmaligem Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther oder Methanol/Wasser (2:5) bei 170–173° schmelzen. Leichtlöslich in Alkoholen, Aceton, Chloroform, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Essigester, unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther.

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$ (474.5) Ber. C 65.81 H 5.52 N 11.81 Gef. C 66.21 H 5.47 N 11.85

Hydrochlorid: 4 g des obigen Verdampfungsrückstandes werden in 20 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 2n HCl auf p_{H} 6.0 eingestellt. Aus der bei 50° filtrierten Lösung kristallisieren im Kühlschrank ca. 2.0 g Hydrochlorid vom Schmp. 155–158°. Leichtlöslich in niederen Alkoholen, Pyridin und Dimethylformamid, schwerlöslich in kaltem Wasser, unlöslich in Chloroform, Äther, Petroläther.

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$ (511.0) Ber. N 10.96 Gef. N 10.78

13. *o-Carboxybenzoyl-histidyl-valin-benzylester (III) (Gemisch zweier Racemate)*: Eine Lösung von 500 mg (1.05 mMol) *Phthalyl-histidyl-valin-benzylester* (II, 12.) in 5 ccm Äthanol und 15 ccm Wasser wird nach Zusatz von 1 ccm Pyridin 4 Stdn. auf 60° erwärmt. Auf Zugabe von 40 ccm Wasser zu der erkalteten Lösung fällt ein kristalliner Niederschlag aus, der nach Absaugen mit 5 ccm Methanol durchgearbeitet und mit Methanol gewaschen wird. Ausb. 420 mg (85% d. Th.) kurze, dünne Nadeln vom Schmp. 175–176.5°. Leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, schwerlöslich in Alkoholen und heißem Wasser, unlöslich in Chloroform, Äther und Petroläther.

$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$ (492.5) Ber. C 63.40 H 5.73 N 11.38 Gef. C 63.16 H 5.70 N 11.25

14. *o-Carboxybenzoyl-histidyl-valin (XII) (Gemisch zweier Racemate)*: Die Lösung von 1.0 g (2.25 mMol) *Phthalyl-histidyl-valin-äthylester* (I, 11.) in 15 ccm Methanol bleibt nach Zugabe von 6.0 ccm n NaOH 45 Min. bei Raumtemperatur stehen. Auf Zusatz von 6.0 ccm n HCl erstarrt bald der Kolbeninhalt zu einem Kristallbrei, der abgesaugt und mit Methanol gewaschen wird. Die feinen, verfilzten Nadelchen (300 mg) schmelzen nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser oder Wasser bei 181–183°. Aus dem i. Vak. auf 5 ccm eingeengten Filtrat kristallisiert weitere Substanz (640 mg) in zu Rosetten vereinigten Prismen, die nach Umkristallisieren aus wenig Wasser bei 140–142° schmelzen. Es handelt sich um das Tetrahydrat des *o-Carboxybenzoyl-histidyl-valins*, das beim Trocknen (100°/0.1 Torr, P_2O_5 , 4 Stdn.) in das als 1. Fraktion gewonnene Monohydrat übergeht. Das letzte Mol. Kristallwasser gibt die Substanz erst beim Schmelzen ab. Leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, je nach Kristallwassergehalt unterschiedlich löslich in Wasser, Alkoholen und Gemischen dieser Lösungsmittel, unlöslich in Chloroform, Äther und Kohlenwasserstoffen. Gesamtausbeute ca. 90% d. Th.

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (420.4) Ber. C 54.28 H 5.75 N 13.33 Gef. C 54.75 H 5.66 N 13.42

15. *Phthalyl-histidyl-valin (XIII) (Gemisch zweier Racemate)*

a) 660 mg (1.4 mMol) *Phthalyl-histidyl-valin-benzylester* (II, 12.) werden in 25 ccm Methanol unter Zusatz von 250 mg Pd-Mohr bis zur Aufnahme von 65 ccm H_2 hydriert (ca. 2 Stdn.). Der Verdampfungsrückstand des Filtrats vom Pd kristallisiert aus 5 ccm Wasser und wird aus 50-proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 285 mg (51% d. Th.) kleine, sechs-

seitige Prismen vom Schmp. 195–197° (Umwandlung bei 100–105°); leichtlöslich in verd. Säuren und Laugen, löslich in Pyridin, Dimethylformamid und 50-proz. Äthanol, schwerlöslich in Alkoholen und Wasser, unlöslich in Chloroform, Äther, Dioxan und Kohlenwasserstoffen. Beim 7fachen Ansatz beträgt die Ausbeute nur 30–33% d. Th.

$C_{19}H_{20}N_4O_5 \cdot H_2O$ (402.4) Ber. C 56.71 H 5.51 N 13.92 Gef. C 56.73 H 5.54 N 13.80

b) 580 mg (1.22 mMol) *o-Carboxybenzoyl-histidyl-valin* · H_2O (XII, 14.) werden 70 Stdn. bei 0.1 Torr über P_2O_5 auf 110° erhitzt und das Sinterprodukt aus 3 ccm Wasser umkristallisiert. Ausb. 320 mg (65% d. Th.).

$C_{19}H_{20}N_4O_5 \cdot H_2O$ (402.4) Ber. C 56.71 H 5.51 N 13.92 H_2O 4.48
Gef. C 57.14 H 5.66 N 13.77 H_2O 4.75

c) (*Hydrochlorid*): Die Lösung von 412 mg (1 mMol) *Phthalyl-histidyl-valin-äthylester* (I, 11.) in 1 ccm halbkonz. Salzsäure (18–19% HCl) wird 10 Min. auf 75–80° erwärmt (bis sich ein Tropfen auf Zugabe von Natronlauge nicht mehr trübt) und im Exsikkator bei 0.6 Torr über KOH und $CaCl_2$ eingedampft (ca. 24 Stdn.). Aus der Lösung des spröden, glasartigen Rückstandes in 3 ccm Methanol wird mit 10 ccm Äther die Substanz schmierig ausgefällt. Beim Abdunsten des Äthers durch ein aufgesetztes, dünn ausgezogenes Glasrohr kristallisiert sie an den Wänden in großen Platten aus, wobei die Schmierre verschwindet. Die Kristalle werden mit Methanol/Äther (1:1, dann steigender Äthergehalt) und Äther gewaschen. Ausb. 135 mg (31% d. Th.), Schmp. 170–175°. Leichtlöslich in Wasser und Methanol, löslich in Äthanol, n-Butanol und triäthylaminhaltigem Chloroform, unlöslich in Chloroform, Äther und Triäthylamin.

$C_{19}H_{20}N_4O_5 \cdot HCl \cdot CH_3OH$ (452.9) Ber. C 53.03 H 5.56 N 12.36
Gef. C 52.09 H 5.64 N 12.51

16. *Tosyl-histidyl-valin-äthylester* (IV) (*Gemisch zweier Racemate*): 1.36 g (7.5 mMol) *D,L-Valin-äthylester* · $HCl^{(12)}$ und 2.45 g (7.5 mMol) *Tosyl-L-histidin* · H_2O (7.) werden in 20 ccm Pyridin mit 0.33 ccm PCl_3 nach Vorschrift 11a kondensiert. Nach zweitägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird die Mischung 1 Stde. auf 80° erwärmt und dann i. Vak. eingedampft. Aus der Lösung des Rückstandes in 50 ccm Wasser wird der Tosylpeptidester durch tropfenweise Zugabe von 2n NaOH bei p_H 5.8 bis 6.8 freigesetzt und mit Essigester extrahiert. Beim Vakuumeindampfen der mit Na_2SO_4 getrockneten Extrakte werden 3 g brauner Sirup erhalten, aus dessen Lösung in 10 ccm Benzol das Produkt auf Zugabe von 5–10 ccm Ligroin rein weiß kristallisiert. Es wird mit Ligroin gewaschen. Ausb. 2.5 g (76% d. Th.) feine, teils aggregierte Nadeln vom Schmp. 119–121°; leichtlöslich in niederen Alkoholen, Chloroform und cyclischen Äthern, löslich in verd. Säuren und Laugen, Essigester, Benzol, unlöslich in Wasser, Äther und Paraffinkohlenwasserstoffen.

$C_{20}H_{28}N_4O_5S$ (436.5) Ber. C 55.03 H 6.47 N 12.84 Gef. C 55.34 H 6.50 N 12.58

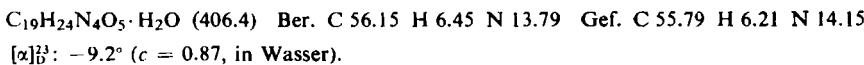
17. *Tosyl-histidyl-valin* (XIV) (*Gemisch zweier Racemate*): Die Lösung von 2.8 g (6.45 mMol) *Tosyl-histidyl-valin-äthylester* (IV, 16.) in 5 ccm Aceton wird mit 14 ccm n NaOH versetzt. Man beläßt 45 Min. bei Raumtemperatur und neutralisiert mit 14 ccm n HCl, worauf nach wenigen Min. die Säure kristallisiert. Durch langsames Eindunsten über $CaCl_2$ wird die Kristallisation vervollständigt. Ausb. an mit wenig Wasser gewaschenem Material 1.8 g (66% d. Th.) lange, dünne Prismen, die oberhalb von 80° zu einem Kristallpulver zerfallen und bei 258.5° (Zers.) schmelzen. Leichtlöslich in Methanol, Eisessig, Pyridin, Dimethylformamid sowie verd. Säuren und Laugen, löslich in Wasser und Äthanol, unlöslich in Aceton, Chloroform und Benzol.

$C_{18}H_{24}N_4O_5S \cdot H_2O$ (426.5) Ber. C 50.69 H 6.14 N 13.14 Gef. C 50.98 H 6.04 N 13.18

18. *Carbobenzoxy-L-histidyl-valin-äthylester (V)* (*Gemisch zweier Diastereomeren*): Eine Lösung von 1.81 g (6 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidin-hydracid*³⁾ in 36 ccm *n* HCl wird bei 5° ratenweise mit 10 ccm *n* NaNO₂-Lösung versetzt und 15 Min. bei -5° belassen. Nach Überschichten mit 40 ccm Essigester werden 10 ccm 50-proz. K₂CO₃-Lösung zugefügt und das ausgefallene Azid sofort mit dem Essigester ausgeschüttelt; die wäßrige Phase wird noch zweimal mit 15 ccm Essigester nachextrahiert und die vereinigten Extrakte kurz mit Na₂SO₄ getrocknet. Inzwischen wird eine Lösung von 1.27 g (7 mMol) *DL-Valin-äthylester-HCl*¹²⁾ in 15 ccm trockenem Tetrahydrofuran bei 0° mit 0.97 ccm Triäthylamin versetzt, das quantitativ ausgefallene Triäthylamin·HCl abgesaugt und gut mit Tetrahydrofuran ausgewaschen. Das Filtrat wird sofort mit der Azidlösung vereinigt, worauf die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur stehenbleibt. Nach Filtration wird die Lösung i. Vak. eingedampft. Die Lösung des erhaltenen Sirups in 25 ccm Essigester wird mit 2*n* HCl, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Beim Behandeln mit Petroläther erstarrt der Sirup zu einem amorphen Pulver. Ausb. 2.0 g (80% d. Th.). Die Substanz sintert oberhalb von 100° und zeigt keinen scharfen Schmp. Leichtlöslich in Alkoholen, Essigester, Eisessig, Chloroform, unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther.



19. *Carbobenzoxy-L-histidyl-valin (XV)* (*Gemisch zweier Diastereomeren*): Die Lösung von 2.0 g (4.8 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-valin-äthylester* (V, 18.) in 10 ccm Methanol bleibt nach Zugabe von 6.5 ccm *n* NaOH 45 Min. stehen. Nach Neutralisation mit 6.5 ccm *n* HCl wird sie i. Vak. bei höchstens 40° eingedampft. Aus dem Extrakt des Rückstandes mit 40 ccm heißem n-Butanol wird die Säure mit 250 ccm Äther ausgefällt als flockige, sich rasch absetzende Masse, die im Zentrifugenglas mit Äther butanolfrei gewaschen wird. Das amorphe Rohprodukt (1.4–1.6 g) kristallisiert aus 15 ccm 90-proz. Äthanol beim Stehenlassen über Nacht. Die Kristalle werden mit Äthanol/Äther (1:1) und Äther gewaschen. Aus der Mutterlauge lässt sich durch Fällen mit Äther und langsames Eindunsten noch eine kleine Menge kristalline Substanz gewinnen. Ausb. 1.2 g (65% d. Th.) kurze Nadeln vom Schmp. 143–145°, leichtlöslich in Pyridin, Dimethylformamid, Methanol und Wasser, löslich in Äthanol, schwerlöslich in Isopropylalkohol, unlöslich in Äther, cyclischen Äthern, Chloroform und Kohlenwasserstoffen.



20. *L-Histidyl-valin (XIX)* (*Gemisch zweier Diastereomeren*): 100 mg (0.26 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-valin* (XV, 19.) werden in 15 ccm 70-proz. Methanol unter Zusatz von 0.1 ccm Eisessig und 50 mg Pd-Mohr im Wasserstoffstrom bis zum Ende der CO₂-Entwicklung hydriert (ca. 2 Stdn.). Der Verdampfungsrückstand des Filtrats kristallisiert über Nacht aus 5 ccm Äthanol. Ausb. 30 mg (46% d. Th.) feine Nadelchen vom Schmp. 206 bis 207° (Zers.). Leichtlöslich in Wasser und Pyridin, schwerlöslich in Alkoholen, unlöslich in Äther.



Derivat des Histidyl-glycins

21. *o-Carboxybenzoyl-DL-histidyl-glycin-äthylester (VI)*: 520 mg *Phthalyl-L-histidin-HCl* (5.) und 224 mg *Glycin-äthylester-HCl* (je 1.61 mMol) werden in 5 ccm Pyridin mit 370 mg (1.8 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷⁾ wie 11b) kondensiert. Die Lösung des sirupösen Verdampfungsrückstandes (0.7 g) in 20 ccm Wasser bleibt nach Zusatz von 2 ccm 2*n* HCl zur Beseitigung überschüssigen Carbodiimids 1 Stde. stehen. Aus dem Filtrat vom rest-

lichen Dicyclohexyl-harnstoff wird wie üblich (11a) durch tropfenweise Zugabe von n NaOH das Kondensationsprodukt freigesetzt (p_{H} 6.6 – 6.8) und mit zweimal 25 ccm Essigester ausgeschüttelt. Der mit Na_2SO_4 getrocknete Extrakt wird i. Vak. zum Sirup eingedampft, aus dessen Lösung in 5 ccm Methanol nach Zugabe von 30 ccm Wasser im Laufe einiger Tage eine kleine Menge unreines Produkt kristallisiert, das abfiltriert und verworfen wird. Aus dem i. Vak. auf 2 ccm eingeengten Filtrat kristallisieren 450 mg (72% d. Th.) kurze, feine Nadeln, die mit wenig kaltem Wasser gewaschen werden. Schmp. nach Umkristallisieren aus Methanol/Äther 160 – 165°. Leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Wasser und Alkoholen, unlöslich in Chloroform und Äther. Die Substanz ist optisch inaktiv.

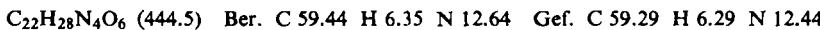


Derivate des Histidyl-leucins

22. *Phthalyl-histidyl-leucin-äthylester (VII)* (*Gemisch zweier Racemate*): 1.72 g *L-Leucin-äthylester-HCl*^{13, 14} und 2.50 g *Phthalyl-DL-histidin* (1.) (je 8.8 mMol) werden in 20 ccm Pyridin mit 0.385 ccm PCl_3 nach der Phosphorazo-Methode (11a)) kondensiert. Die filtrierte Lösung des Verdampfungsrückstandes in 50 ccm Wasser wird nach Zugabe von 3.05 ccm Triäthylamin dreimal mit je 25 ccm Essigester ausgeschüttelt. Der Ausszug wird nach Trocknen mit Na_2SO_4 i. Vak. zum Sirup (3.5 g) eingedampft, der aus 6 ccm Benzol mit 100 ccm Petroläther umgefällt wird. Das nach ca. 24 Stdn. erstarrte Produkt wird mit Petroläther gewaschen und aus Benzol/Cyclohexan umkristallisiert. Ausb. 3.0 g (80% d. Th.) leichte, sternförmige Kristallaggregate, die bei 105° sintern und bei 122 – 125° schmelzen. Leichtlöslich in Alkoholen, Pyridin, Dimethylformamid sowie verd. Säuren und Laugen, löslich in Essigester, Benzol, Toluol und cyclischen Äthern, schwerlöslich in Äther, unlöslich in Wasser und Petroläther.



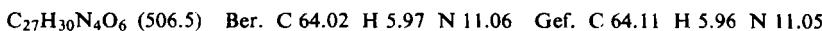
23. *o-Carboxybenzoyl-L-histidyl-L-leucin-äthylester (VIII)*: 1.29 g *Phthalyl-L-histidin-HCl* (5.) und 0.785 g *L-Leucin-äthylester-HCl*^{13, 14} (je 4 mMol) werden in 10 ccm Pyridin mit 0.910 g (4.4 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷ entsprechend Vorschrift 11b) kondensiert. Die Lösung des sirupösen Verdampfungsrückstandes in 30 ccm Wasser bleibt nach Zusatz von 2 ccm $2n$ HCl zur Beseitigung restlichen Carbodiimids 1 Stde. stehen und wird nach Filtrieren mit 50 ccm Essigester überschichtet. Durch Zugabe von 8 ccm n NaOH wird das Reaktionsprodukt bei p_{H} 6.8 – 7.0 freigesetzt und sofort mit dem Essigester aufgenommen. Durch Eindampfen des mit Na_2SO_4 getrockneten Extrakts i. Vak. wird ein sirupöses Rohprodukt gewonnen, das, aus 10 ccm Methanol mit 60 ccm Wasser umgefällt, im Laufe einiger Tage kristallisiert. Ausb. 1.4 g (79% d. Th.) kurze, zu Büscheln vereinigte Nadelchen, die nach Umkristallisieren aus Methanol/Äther bei 179 – 180° schmelzen. Leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Alkoholen, schwerlöslich in Wasser, unlöslich in Chloroform, Äther und Dioxan.



$[\alpha]_D^{25} = -59.6^\circ$ ($c = 3.10$, in n HCl).

24. *o-Carboxybenzoyl-histidyl-leucin-benzylester (IX)* (*Gemisch zweier Racemate*): 1.45 g *Phthalyl-DL-histidin* (1.) und 1.32 g *L-Leucin-benzylester-HCl* (10.) (je 5.1 mMol) werden in 20 ccm Pyridin mit 0.22 ccm PCl_3 nach der Phosphorazo-Methode (11a)) kondensiert. Die Lösung des Verdampfungsrückstandes in 50 ccm Chloroform wird nach Zugabe von 1.76 ccm Triäthylamin dreimal mit je 100 ccm Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das erhaltene Harz wird aus 30 ccm Methanol mit 100 ccm Wasser umgefällt. Im Laufe einiger Wochen kristallisiert die Substanz vollständig, wird abgesaugt und mit

Wasser gewaschen. Ausb. 2.0 g (77% d. Th.) lange, derbe Prismen. Durch verlustreiches Umkristallisieren aus Methanol/Äther entstehen feine Nadeln vom Schmp. 151–153°. Leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Alkoholen, schwerlöslich in Wasser, unlöslich in Aceton, Äther, Dioxan und Petroläther.



25. *Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin-äthylester* (*X*): 1.81 g (6 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidin-hydrazid*³⁾ und 1.37 g (7 mMol) *L-Leucin-äthylester·HCl*^{13, 14)} werden entsprechend Vorschrift 18. kondensiert und die Mischung wie dort aufgearbeitet. Ausb. 2.1 g (81% d. Th.) amorphes Rohprodukt, das im Gegensatz zum homologen Methylester (Schmp. 125–128°³⁾) nicht zur Kristallisation gebracht werden kann.

26. *Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin*³⁾ (*XVI*): 2.5 g (5.8 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin-äthylester* (*X*, 25.) werden in 10 ccm Methanol mit 9 ccm *n* NaOH 45 Min. verseift und die Lösung mit 9 ccm *n* HCl neutralisiert. Der Verdampfungsrückstand kristallisiert über Nacht aus 3 ccm Äthanol und 14 ccm Wasser. Das Produkt wird mit Wasser gewaschen und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 1.5 g (65% d. Th.). Schmp. 180–184° (Lit.³⁾: 185°). [Katalytische Hydrierung zum L-Histidyl-L-leucin siehe I.c.³⁾]. $[\alpha]_D^{20} = -8.1^\circ$ ($c = 1.60$, in 96-proz. Äthanol) [Lit.³⁾: $[\alpha]_D^{22} = -7^\circ$ ($c = 1$, in Äthanol)].

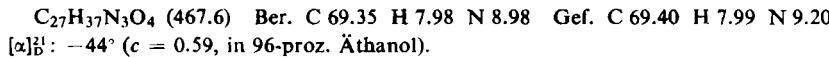
Derivate des Leucyl-valins

27. *Phthalyl-leucyl-valin-äthylester* (*XI*) (Gemisch zweier Racemate)

a) 4.38 g *Phthalyl-L-leucin*^{8, 11b)} und 3.10 g *DL-Valin-äthylester·HCl*¹²⁾ (je 17 mMol) werden in 20 ccm Pyridin mit 0.75 ccm PCl₃ nach der Phosphorazo-Methode (11a)) kondensiert. Der Verdampfungsrückstand der zum Schluß noch 1 Stde. auf 80–85° erhitzen Reaktionslösung wird in 50 ccm Chloroform gelöst. Nach dreimaligem Waschen mit 100 ccm Wasser (bis zur Phosphat-Freiheit) wird die Lösung mit Na₂SO₄ getrocknet und zu einem Sirup eingedampft, der beim Behandeln mit Petroläther amorph erstarrt. Ausb. 5.4 g (81% d. Th.).

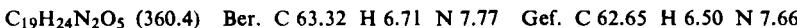
b) 1.82 g *DL-Valin-äthylester·HCl*¹²⁾ (10 mMol) werden in 20 ccm trockenem Tetrahydrofuran bei 0° mit 1.38 ccm Triäthylamin versetzt. Nach 1 Stde. wird das Triäthylamin·HCl abgesaugt und gut mit Tetrahydrofuran ausgewaschen. Im Filtrat werden 2.57 g (10 mMol) *Phthalyl-L-leucin*^{8, 11b)} und nach Abkühlen auf –8° 2.26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷⁾ gelöst, dann bleibt die Lösung 2 Stdn. bei –5° und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Das Filtrat vom auskristallisierten *N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff* wird i. Vak. eingedampft und die Lösung des Sirups in 25 ccm Essigester mit 25 ccm 2*n* HCl und zweimal mit 25 ccm Wasser gewaschen. Durch Eindampfen der getrockneten (Na₂SO₄) und filtrierten Lösung i. Vak. werden 3.5 g (90% d. Th.) beim Stehenlassen glasartig erstarrndes Harz erhalten; leichtlöslich in Alkoholen, Chloroform, Essigester, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Benzol und Toluol, unlöslich in Äther, Petroläther und Wasser.

Nebenprodukt: *N-[Phthalyl-L-leucyl]-N,N'-dicyclohexyl-harnstoff* (*XXVII*): Die vorstehende Synthese (27 b)) wird bei Raumtemperatur ausgeführt, worauf aus der Lösung des sirupösen Rohprodukts in 20 ccm Essigester 0.75 g (16% d. Th.) lange Prismen kristallisieren, die mit Essigester gewaschen und aus Methanol/Wasser umkristallisiert werden. Schmp. 180–183°. Löslich in Pyridin und Dimethylformamid, schwerlöslich in Alkoholen und Essigester, unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther.

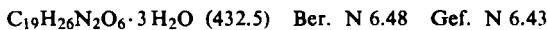


28. *Phthalyl-leucyl-valin* (*XVII*) (Gemisch zweier Racemate): 1.0 g (2.6 mMol) amorpher *Phthalyl-leucyl-valin-äthylester* (*XI*, 27.) werden mit 10 ccm rauchender Salzsäure (*d* 1.19)

bei Raumtemperatur 2 Wochen verschlossen stehengelassen. Nach Abgießen der Salzsäure wird das teilweise kristalline Produkt mit 2 ccm Eisessig behandelt, wobei vorwiegend die sirupösen Anteile in Lösung gehen. Die zurückbleibenden Kristalle werden mit Wasser gewaschen und aus Methanol/Wasser, eventuell unter Behandlung mit Kohle, umkristallisiert. Ausb. 0.4 g (43 % d. Th.) sechsseitige, schiefe, abgestumpfte Pyramiden vom Schmp. 173 bis 175°; leichtlöslich in Alkoholen, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Eisessig, unlöslich in Wasser und Benzol.



29. *o-Carboxybenzoyl-leucyl-valin (XVIII)* (*Gemisch zweier Racemate*): Die Lösung von 3.0 g (7.7 mMol) *Phthalyl-leucyl-valin-äthylester* (XI, 27.) in 5 ccm Methanol wird mit 5 ccm 2*n* NaOH versetzt. Nach 1 Stde. wird sie mit konz. Salzsäure vorsichtig auf pH 1 angesäuert. Das ausfallende Öl kristallisiert rasch. Nach 1 stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird die Masse abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 2.3 g (70 % d. Th.) kurze Nadelchen vom Schmp. 138–142°. Leichtlöslich in Alkoholen, Pyridin und Dimethylformamid, schwerlöslich in Wasser, unlöslich in Äther.



Histidyl-valyl-leucin und -Derivate

30. *Carbobenzoxy-L-histidyl-valyl-L-leucin-äthylester (XX)* (*Gemisch zweier Diastereomeren*): 780 mg *Carbobenzoxy-L-histidyl-valin* (XV, 19.) und 390 mg *L-Leucin-äthyl-ester-HCl*^{13, 14)} (je 2 mMol) werden in 30 ccm Tetrahydrofuran nach HCl-Beseitigung mit 0.28 ccm Triäthylamin mit 455 mg (2.2 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷⁾ entsprechend Vorschrift 27 b) kondensiert. Die Lösung des sirupösen Verdampfungsrückstandes in 20 ccm Chloroform wird dreimal mit 20 ccm 5-proz. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Durch Behandeln mit Petroläther erstarrt der Sirup amorph; er wird in dieser Form weiterverarbeitet. Ausb. 900 mg (85 % d. Th.); leichtlöslich in Alkoholen, Chloroform, Tetrahydrofuran und Pyridin, schwerlöslich in Essigester, unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther.

31. *Carbobenzoxy-L-histidyl-valyl-L-leucin (XXI)* (*Gemisch zweier Diastereomeren*): 1.6 g (3 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-valyl-L-leucin-äthylester* (XX, 30.), gelöst in 13 ccm Methanol, werden mit 6.4 ccm *n* NaOH versetzt. Nach 1 Stde. wird die Lösung mit 6.4 ccm *n* HCl neutralisiert und filtriert. Durch Eindampfen i. Vak. entsteht ein teilkristalliner Rückstand, aus dem das *Carbobenzoxy-tripeptid* mit 20 ccm absolut. Äthanol herausgelöst wird. Aus dem auf 5–8 ccm eingeengten Filtrat vom NaCl wird mit 150 ccm Petroläther die Säure ausgefällt, die mit Äther gewaschen wird. Ausb. 1.25 g (83 % d. Th.). Durch Umkristallisieren aus 70-proz. Äthanol entstehen undeutlich kristalline, leichte Flocken vom Schmp. 135°; leichtlöslich in Alkoholen, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Wasser, unlöslich in Benzol, Äther und Petroläther.



[α]_D²²: −7.4° (c = 1.88, in 96-proz. Äthanol).

Pikrat: Die Lösung von 50 mg *Carbobenzoxy-tripeptid* und 23 mg *Pikrinsäure* in 2.0 ccm Methanol und 1.5 ccm Wasser wird im Exsikkator über CaCl₂ eingedunstet, wobei das Lösungsvolumen durch Zugabe von 50-proz. Methanol auf ca. 2 ccm gehalten wird. Nach 4 Tagen wird das auskristallisierte Salz abgesaugt und mit 50-proz. Methanol gewaschen. Ausb. 40 mg (57 % d. Th.). Schmp. 121–123°.



32. *L-Histidyl-valyl-L-leucin (XXII) (Gemisch zweier Diastereomeren)*

a) 0.5 g (ca. 1 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-valyl-L-leucin* (XXI, 31.) werden in 20 ccm 75-proz. Methanol nach Zusatz von 0.3 ccm Eisessig und 100 mg Pd-Mohr ca. 2 Stdn. bis zum Ende der CO₂-Entwicklung hydriert. Der Verdampfungsrückstand des Filtrats vom Pd kristallisiert aus 5 ccm 90-proz. Äthanol innerhalb von 24 Stdn., wird abgesaugt und mit Äthanol gewaschen. Ausb. 0.20 g (50% d. Th.) lange, dünne Nadelchen vom Schmp. 242 bis 243° (Zers.). Leichtlöslich in Wasser, löslich in Pyridin und Dimethylformamid, schwerlöslich in Alkoholen, unlöslich in Äther, Chloroform und Kohlenwasserstoffen.

C₁₇H₂₉N₅O₄·2H₂O (403.5) Ber. C 50.60 H 8.24 N 17.36 Gef. C 51.26 H 7.90 N 17.51
[α]_D²⁵: -5° (c = 1.21, in Wasser).

Bei 16 stdg. Trocknen über P₂O₅ bei 110°/0.1 Torr gibt das Peptid 1 Mol. Kristallwasser ab:

C₁₇H₂₉N₅O₄·H₂O (385.5) Ber. C 52.98 H 8.09 N 18.17 Gef. C 53.28 H 7.62 N 18.21

b) 100 mg (ca. 0.2 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-valyl-L-leucin·2H₂O* (XXI, 31.) werden in 1 ccm rauchender Salzsäure (d 1.19) 15 Min. auf 55° erwärmt. Die trübe Lösung wird bei 35° i. Vak. eingedampft. Die Lösung des Sirups in 2 ccm Wasser wird mit Diäthylamin (zuletzt mit Wasser verdünnt) auf pH 5.8–6.0 eingestellt und i. Vak. eingedampft, wobei Schäumen durch einige Tropfen Amylalkohol unterbunden wird. Aus der Lösung des Sirups in 5 ccm Äthanol kristallisieren im Laufe einiger Tage 45 mg (54% d. Th.) Tripeptid mit den angegebenen Eigenschaften. Es kann unter großen Verlusten aus 50 Tln. 80-proz. Methanol umkristallisiert werden.

Pikrat: Die Mischung von 73 mg Peptid (XXII, 32.) in 1 ccm Wasser und 42 mg Pikrinsäure in 1 ccm Methanol (je 0.2 mMol) wird im Exsikkator über CaCl₂ eingedunstet, wobei das Volumen durch Zugabe von 50-proz. Methanol auf 1 ccm gehalten wird. Das anfangs ölig ausfallende Salz kristallisiert während einiger Tage, wird abgesaugt und mit 50-proz. Methanol gewaschen. Ausb. 55 mg hellgelbe, sehr feine, kurze Nadelchen vom Schmp. 133 bis 136°.

C₁₇H₂₉N₅O₄·2C₆H₃N₃O₇·H₂O (843.7) Ber. C 41.28 H 4.42 N 18.26
Gef. C 41.12 H 4.38 N 17.95

33. *Tosyl-histidyl-valyl-leucin-äthylester (XXIII) (Gemisch vierer Racemate):* 1.00 g *Tosyl-histidyl-valin·H₂O* (XIV, 17.) und 0.40 g *L-Leucin-äthylester·HCl*^{13,14} (je 2.35 mMol) werden in 10 ccm wasserfreiem Pyridin mit 0.10 ccm PCl₃ nach der Phosphorazo-Methode (11a) kondensiert und die Mischung zum Schluß 30 Min. auf 80° erhitzt. Die Lösung des Verdampfungsrückstandes in 20 ccm Chloroform wird nach Zugabe von 0.82 ccm Triäthylamin dreimal mit 20 ccm Wasser gewaschen (bis zur Phosphat-Freiheit). Die mit Na₂SO₄ getrocknete Lösung wird i. Vak. eingedampft zu einem Sirup, aus dessen Lösung in 10 ccm heißem Essigester in der Kälte 0.60 g (47% d. Th.) undeutlich kristalline Flocken ausfallen, die mit Essigester/Petroläther gewaschen werden. Schmp. 163–165° (unscharf); sehr leicht löslich in Pyridin, leichtlöslich in Alkoholen, Chloroform und Dimethylformamid, löslich in Essigester, schwerlöslich in Benzol, unlöslich in Äther und Paraffinkohlenwasserstoffen.

C₂₆H₃₉N₅O₆S (549.7) Ber. N 12.74 Gef. N 12.91

34. *Tosyl-histidyl-valyl-leucin (XXIV) (Gemisch vierer Racemate):* Eine Lösung von 400 mg (0.73 mMol) *Tosyl-histidyl-valyl-leucin-äthylester* (XXIII, 33.) in 4 ccm Aceton wird mit 1.8 ccm n NaOH versetzt und nach 1 Stde. mit 1.8 ccm n HCl neutralisiert. Beim Eindunsten im Exsikkator über CaCl₂, wobei das Volumen der Lösung durch Zugabe von 50-proz. Aceton auf 4 ccm gehalten wird, kristallisieren innerhalb von 4 Tagen 370 mg (98% d. Th.) dünne, teilweise aggregierte Nadelchen, die mit Wasser gewaschen und durch Eindunsten

einer Lösung in Aceton umkristallisiert werden. Schmp. 160–164° (unscharf); leichtlöslich in Pyridin und Dimethylformamid, löslich in 50-proz. Aceton, schwerlöslich in Wasser und Aceton, unlöslich in Äther.

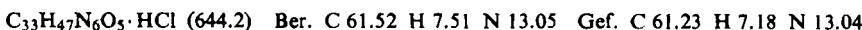


Derivate des Histidyl-leucyl-valins

35. *Carbobenzoxy-L-histidyl-leucyl-valin-äthylester (XXV)* (*Gemisch mehrerer Diastereomeren*): 800 mg *Carbobenzoxy-L-histidyl-L-leucin* (XVI, 26.) und 360 mg *DL-Valin-äthylester·HCl*¹²⁾ (je 2 mMol) werden in 20 ccm absol. Pyridin mit 455 mg Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁷⁾ wie 11b) kondensiert. Die Lösung des Sirups in 30 ccm Essigester wird nach Zugabe von 0.28 ccm Triäthylamin, 1 Stde. Aufbewahren bei –20°, Filtration, zweimaligem Waschen mit 20 ccm Wasser und Trocknen mit Na₂SO₄ i. Vak. eingedampft. Der gelbliche Sirup erstarrt beim Behandeln mit Petroläther und wird aus Benzol/Petroläther umgefällt. Ausb. 1.0 g (95% d. Th.) amorphes Material; leichtlöslich in Alkoholen, Chloroform und Pyridin, löslich in Essigester und Benzol, unlöslich in Äther und Petroläther.

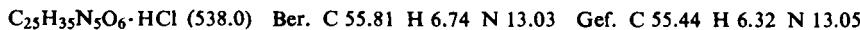


Nebenprodukt: *N-[Carbobenzoxy-L-histidyl-leucyl]-N,N'-dicyclohexyl-harnstoff·HCl (XXVIII)*: Wird die vorstehende Synthese (35.) bei Raumtemperatur ausgeführt, so läßt sich aus dem Rohprodukt nach Lösen in 20 ccm 2n HCl mit zweimal 20 ccm Essigester ein Harnstoff-Derivat extrahieren. Die Esterphase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Sirup kristallisiert beim Anreiben mit 5 ccm Essigester. Ausb. 230 mg (18% d. Th.). Durch Umkristallisieren aus 42 ccm Äthanol/Essigester (1:5) werden 175 mg dünne, dreieckige Blättchen erhalten vom Schmp. 200–203°. Leichtlöslich in Alkoholen, schwerlöslich in Wasser und Essigester, unlöslich in Äther.



[α]_D²⁵: –15° (c = 0.74, in 96-proz. Äthanol).

36. *Carbobenzoxy-L-histidyl-leucyl-valin·HCl (XXVI)* (*Gemisch mehrerer Diastereomeren*): Die Lösung von 1.0 g (1.9 mMol) *Carbobenzoxy-L-histidyl-leucyl-valin-äthylester* (XXV, 35.) in 8 ccm Methanol wird mit 5.0 ccm n NaOH versetzt und bei Auftreten einer Trübung mit wenig Methanol verdünnt. Nach 1 Stde. bei Raumtemperatur wird mit 5.0 ccm n HCl neutralisiert, filtriert und i. Vak. bei höchstens 40° eingeengt, die flockig ausgesetzte Säure (ca. 700 mg) abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Durch Behandeln des Verdampfrückstandes des Filtrats mit 10 ccm absol. Äthanol, Filtrieren vom ungelösten NaCl und Versetzen des Filtrats mit 150 ccm Petroläther werden weitere 300 mg flockiges Rohprodukt gewonnen. Die gesamte Menge wird in 10 ccm Wasser und 2 ccm n HCl warm gelöst, die Lösung filtriert und i. Vak. eingeengt, so daß die Substanz zunächst gelatinös ausfällt. Das über Nacht kristallisierte Produkt wird abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Ausb. 0.82 g (87% d. Th.) lange Nadeln vom Schmp. 195–197°. Durch Umkristallisieren aus Äthanol/Äther werden zu Klumpen vereinigte Nadelchen erhalten. Leichtlöslich in Alkoholen, Pyridin und Dimethylformamid, löslich in Wasser und Eisessig, unlöslich in Aceton, Benzol und Äther.



[α]_D²⁵: –21° (c = 0.53, in 96-proz. Äthanol).