

6. *Cbo-D-Phenylalanyl-glycyl-D-valin-äthylester*: Herstellung nach 5. aus *Cbo-D-Phenylalanin* und *Glycyl-D-valin-äthylester* ( $[\alpha]_D^{25}$ : +15.6°;  $c = 2.23$ , in absol. Äthanol). Ausb. 50 % d. Th. *Cbo-Tripeptidester*; Schmp. 131–133°;  $[\alpha]_D^{25}$ : +18.3° ( $c = 2.31$ , in absol. Methanol).

Gef. C 64.28 H 6.97 N 8.71

GERHARD SCHRAMM und HANS WISSMANN

## Peptidsynthesen mit Hilfe von Polyphosphorsäureestern

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

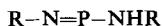
(Eingegangen am 20. Februar 1958)

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Peptidverbindungen beschrieben, das von einer Aktivierung der Aminokomponente durch während der Reaktion entstehende Polyphosphorsäureester ausgeht.

Bei der Synthese von Peptiden geht man im allgemeinen von energiereichen Derivaten aus. Die Aktivierung der Ausgangskomponenten kann entweder an der Carboxyl- oder an der Aminogruppe vorgenommen werden.

Bei der Carboxyl-Aktivierung werden unter Schutz der Aminogruppe meist gemischte Anhydride mit organischen oder anorganischen Säuren verwendet. Eine ausführliche Beschreibung neuerer Arbeiten findet sich z. B. bei TH. WIELAND und B. HEINKE<sup>1)</sup>. Der Nachteil dieser Aktivierung besteht darin, daß bei der Herstellung der Säureanhydride die Gefahr der Racemisierung besteht, die wahrscheinlich über die intermediäre Bildung von Azlactonen erfolgt.

Bei der Aktivierung der Aminogruppe ist die Gefahr der Racemisierung wesentlich geringer. Für diese Aktivierung sind bisher fast ausschließlich Verbindungen des 3-wertigen Phosphors benützt worden. Bei der Phosphorazo-Methode von ST. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER<sup>2)</sup> wird die Aminogruppe mit Phosphortrichlorid zur Phosphorazo-Gruppe umgesetzt:



Diese reagiert dann mit der Carboxylgruppe unter Bildung einer Säureamid-Bindung. Die Methode liefert gute Ausbeuten bei der Synthese von Oligopeptiden. Die Synthese höherer Peptide verläuft hingegen oft unbefriedigend, da die Löslichkeit der Reaktionspartner in den verwendeten Lösungsmitteln zu gering ist. Von ANDERSON und Mitarbb.<sup>3a-c)</sup> wurde die Aktivierung der Aminogruppe durch Umsetzung mit Phosphorigsäure-diäthylester-chlorid oder Tetraäthylpyrophosphit vorgenommen. Die hierbei entstehenden Phosphitamide setzen sich ebenfalls ohne Racemisierung mit Carboxylgruppen unter Bildung der Säureamid-

<sup>1)</sup> Angew. Chem. **69**, 362 [1957].

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 [1953].

<sup>3)</sup> a) G. W. ANDERSON, J. BLODINGER, R. W. JOUNG und A. D. WELCHER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5304 [1952]; b) G. W. ANDERSON und R. W. JOUNG, ebenda **74**, 5307 [1952]; c) G. W. ANDERSON, J. BLODINGER und A. D. WELCHER, ebenda **74**, 5309 [1952].

Bindung um, wobei in beiden Fällen Diäthylphosphit abgespalten wird. Schwierigkeiten bereitet bei dieser Methode die verhältnismäßig umständliche Herstellung und die geringe Haltbarkeit der Aktivierungsmittel. Amidverbindungen des 5-wertigen Phosphors wurden bisher praktisch nicht verwendet, da sie schwer zugänglich waren.

Im folgenden wird ein Verfahren beschrieben, bei dem auf einfache Weise Aminoverbindungen durch Umsetzung mit Derivaten der Polyphosphorsäure aktiviert und anschließend durch Reaktion mit carboxylhaltigen Verbindungen in Säureamid-Derivate umgewandelt werden können. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß, wie auch sonst bei Aktivierung der Aminogruppe, keine Racemisierung auftritt und die Art der Lösungsmittel auch die Herstellung höherer Peptide in guter Ausbeute zuläßt. Das Verfahren kann weiterhin auch zur Polykondensation von Verbindungen benützt werden, die sowohl eine freie Amino- als auch eine Carboxylgruppe enthalten.

#### A. DIE DARSTELLUNG VON OLIGOPEPTIDEN

Bei der Synthese von Oligopeptiden geht man so vor, daß man bei einem Reaktionspartner die Carboxylgruppe durch Veresterung schützt und die freie Aminogruppe mit Diphosphorpentoxyd in einem alkoxyhaltigen Lösungsmittel reagieren läßt. Als Lösungsmittel bewährte sich das bereits von Anderson verwandte Diäthylphosphit besonders gut. Es zeigte sich, daß die Reaktion am besten in alkalischem Medium, z. B. in Gegenwart von tertiären Basen, vor sich geht. Es ist nicht notwendig, für die Reaktion die freien Ester zu verwenden, sondern es können auch die leichter zugänglichen Hydrochloride benützt werden. Bei dem zweiten Reaktionspartner wird die Aminogruppe in einer der üblichen Weisen, z. B. durch den Carbobenzoxy(Cbzo)-

Tab. 1. Unter Verwendung von Diphosphorpentoxyd in Diäthylphosphitlösung dargestellte Peptid-Derivate

Syntheseprodukt	Ausgangsmaterial	$[\alpha]_D^{20}$ *	Ausb. in % d. Th.	Gef. Schmp.	Lit.
Cbzo-Gly-Gly-Äthyl	Gly-Äthyl·HCl; Cbzo-Gly		83	81°	82° <sup>2)</sup>
Cbzo-DL-Ala-Gly-Äthyl	Gly-Äthyl·HCl; Cbzo-DL-Ala		81	85°	—
Cbzo-Gly-Gly-Gly-Äthyl	Gly-Äthyl·HCl; Cbzo-Gly-Gly		77	165—166°	165—167° <sup>3b)</sup>
Cbzo-DL-Ala-Gly-Gly-Äthyl	Gly-Gly-Äthyl·HCl; Cbzo-DL-Ala		79	114°	—
Cbzo-Gly-L-Leu	L-Leu-Äthyl·HCl; Cbzo-Gly	—8.4°	56	104°	104° <sup>2)</sup>
Cbzo-Gly-L-Leu-Gly-Äthyl	Cbzo-Gly-L-Leu; Gly-Äthyl	—31.8°	63	104—105°	—
Cbzo-L-Phe-Gly-Äthyl	Gly-Äthyl·HCl; Cbzo-L-Phe	—17° <sup>***)</sup>	60	108°	109° <sup>3b)</sup>
Cbzo-Leu-Gly-Gly-Äthyl	Cbzo-Leu; Gly-Gly-Äthyl·HCl		50	104°	—
Cbzo·(DL-Ala-Gly-Gly) <sub>2</sub> Äthyl	Cbzo-DL-Ala-Gly-Gly + DL-Ala-Gly-Gly-Äthyl·HCl		30	201°	—

\* Spezif. Drehwerte gemessen in absol. Äthanol. \*\* Lit. 3b): —16°.

Rest geschützt und die freie Carboxylgruppe mit der aktivierten Aminoverbindung zur Reaktion gebracht. Nach der Reaktion können die schützenden Gruppen in der üblichen Weise wieder entfernt werden, wie es im experimentellen Teil an einigen Beispielen beschrieben wird.

Wie die in Tab. 1 zusammengefaßten Beispiele zeigen, liefert diese einfache und schnell durchführbare Versuchsanordnung recht gute Ausbeuten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Menge an analysenreiner kristallisierter Substanz. Besonders hervorzuheben ist, daß sich auch die schwer löslichen Peptid-Derivate, wie Cbz-Gly-Gly-Äthylester<sup>\*)</sup> nach diesem Verfahren gut herstellen lassen. Die bei dem Hexapeptid angegebenen Ausbeuten lassen sich wahrscheinlich durch weitere Versuche noch erhöhen.

#### B. PRÜFUNG AUF RACEMISIERUNG

Besonders wichtig erscheint uns die Frage, ob bei dieser Reaktion die optische Aktivität der Ausgangskomponenten erhalten bleibt. Um diese Prüfung zu ermöglichen, wurden die hergestellten Peptide durch saure Hydrolyse wieder in die Aminosäuren zerlegt und ihre optische Drehung mit der des Ausgangsmaterials verglichen. Bei der Synthese des Cbz-Gly-L-Leu-Äthylesters, bei der die Bildung der Peptidbindung an der Aminogruppe der optisch aktiven Aminosäure erfolgt, fanden wir für das Ausgangsmaterial  $[\alpha]_D: +11.59^\circ$ , für das zurückgewonnene Material  $+11.60^\circ$ .

Als Beispiel für eine Synthese, bei der die Carboxylgruppe der optisch aktiven Aminosäure reagiert, seien die Ergebnisse beim Cbz-Gly-L-Leu-Gly-Äthylester wiedergegeben: Ausgangsmaterial  $[\alpha]_D: +11.15 \pm 0.5^\circ$ , zurückgewonnenes Material  $+11.60 \pm 0.5^\circ$ .

Es ist also auch hier innerhalb der Meßgenauigkeit keine Racemisierung festzustellen.

#### C. DIE POLYKONDENSATION DES DL-ALANYL-GLYCYL-GLYCINS

Die beschriebene Reaktion läßt sich auch zur Polykondensation bifunktionaler freier Peptide verwenden. Als Beispiel sei die Kondensation des Tripeptids DL-Ala-Gly-Gly beschrieben. Die Arbeitsweise ist dabei grundsätzlich dieselbe wie bei der Synthese der Oligopeptide. An Stelle der beiden monofunktionellen Amino- bzw. Carboxylderivate tritt hier das bifunktionelle freie Peptid. Nach der Aktivierung des Tripeptids mit  $P_2O_5$  in Diäthylphosphit wurde 2 Stdn. auf  $100^\circ$  erhitzt. Nach dem Herauslösen des Polyphosphorsäureesters und des Diäthylphosphits wurden dann die entstandenen Polypeptide nach der Methode von G. SCHRAMM und I. v. BRUNN-LEUBE<sup>4)</sup> mit Fluordinitrobenzol umgesetzt. Die papierchromatographische Auftrennung der entstandenen Dinitrophenyl(DNP)-peptide ergab 8 Peptidbanden. Durch Erwärmen von Ala-Gly-Gly-Methylester waren früher von G. SCHRAMM und H. RESTLE<sup>5)</sup> die gleichen Kondensationsprodukte erhalten worden, deren Molekülgröße durch Infrarotmessungen<sup>6)</sup> festgelegt worden war. Ein Vergleich der  $R_F$ -Werte gestattete daher auch die Identifizierung der hier aus dem freien Peptid erhaltenen Kondensationsprodukte. Es ergaben sich die zu erwartenden Kettengliederzahlen bis

\*) Für die Aminosäurereste werden die üblichen Abkürzungen gebraucht.

4) Chem. Ber. 89, 2045 [1956]. 5) Makromolekulare Chem. 13, 103 [1954].

6) U. SCHIEDT und H. RESTLE, Z. Naturforsch. 9b, 182 [1954].

hinauf zum 24-Peptid. In Tab. 2 ist der mengenmäßige Anteil der einzelnen Polypeptide, wie er sich aus den Extinktionsmessungen der Banden ergab, zusammengestellt. Ein Kontrollversuch, der unter den gleichen Bedingungen in Diäthylphosphit, aber ohne Zusatz von  $P_2O_5$  durchgeführt wurde, ergab nur eine kleine Menge an Hexapeptid. Es ist bemerkenswert, daß bei der hier beschriebenen Kondensation die Nebenreaktionen wesentlich geringer sind als bei der Kondensation des Methyl-esters. Bei den früheren Versuchen war parallel zur Kondensation ein Abbau unter Bildung von Diketopiperazinen beobachtet worden<sup>5)</sup>, deren Auftreten unter den hier angewandten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Tab. 2. Produkte der Kondensation von 47 mg Ala-Gly-Gly mit Diphosphorpentoxyd/Diäthylphosphit

Bande Nr.	Ketten- glieder- zahl	Rel. $R_F$ -Wert, bez. auf DNP- Ala-Gly-Gly = 1	Ausb. an Polypeptiden		
			in $\mu$ Mol	in mg Substanz	in % d. Summe
1	3	1.0	11.2	4.12	44.5
2	6	0.8	5.4	3.00	32.5
3	9	0.55	1.95	1.44	15.4
4	12	0.31	0.36	0.245	2.6
5	15	0.22	0.17	0.196	2.1
6	18	0.17	0.20	0.264	2.8
7	21	0.09	0.06	0.083	0.9
8	24	0.045	unterhalb der Meßbarkeitsgrenze		
			Summe:	9.348	100.8

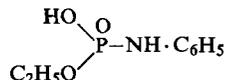
#### D. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN REAKTIONSMCHANISMUS

Die Annahme, daß es sich bei der beschriebenen Reaktion um eine Aktivierung der Aminogruppe handelt, wurde dadurch gestützt, daß in einzelnen Fällen die aktivierte Aminokomponente isoliert und dann in einer zweiten Reaktion mit einer freien Carboxylgruppe umgesetzt wurde. Für diese Modellversuche wählten wir als Amino-Verbindung das Anilin. Dieses wurde in der oben beschriebenen Weise mit einer Lösung von  $P_2O_5$  in Diäthylphosphit bei  $100^\circ$  zur Reaktion gebracht. Nach Fällen mit Äther und Umfällen aus Äther/Tetrahydrofuran konnte aus der Reaktionslösung eine feste Substanz erhalten werden, die tatsächlich nach Umsetzung mit Cbzo-Gly in guter Ausbeute das erwartete Cbzo-Gly-Anilid lieferte. Bei einem Kontrollversuch, der mit Anilin und Cbzo-Gly unter sonst gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zugabe von  $P_2O_5$  durchgeführt wurde, wurden nur Spuren von Cbzo-Gly-Anilid erhalten.

Zur Charakterisierung des aktiven Zwischenproduktes wurde dieses mehrmals aus wasserfreiem Tetrahydrofuran mit Äther umgefällt. Eine weitere Reinigung der farblosen amorphen Substanz war wegen ihrer Zersetzlichkeit nicht möglich. Die Analysendaten sind aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich.

Phosphorsäure-monoäthylester-monoanilid	Ber. N 6.9 P 15.4
„Aktiviertes Anilin“ aus Diphosphorpentoxyd/Diäthylphosphit	Gef. N 6.8 P 14.9
„Aktiviertes Anilin“ aus Metaphosphorsäure-äthylester	Gef. N 7.7 P 14.5

Aus diesen Werten folgt ein etwa äquimolares Verhältnis von Phosphorsäure und Anilin. Die Analysenwerte stimmen mit der Summenformel des Phosphorsäure-mono-äthylester-monoanilids (nebenstehende Formel) etwa überein.



In der Verbindung liegt der Phosphor in 5-wertiger Form vor, da eine Probe der Substanz Jod in wäßriger Lösung auch beim Kochen nicht reduzierte. Um diese Strukturformel weiter zu stützen, wurde das Phosphorsäureester-anilid auf übersichtliche Weise hergestellt und mit dem gefundenen Zwischenprodukt der Synthese verglichen. Nach dem von K. LANGHELD<sup>7)</sup> angegebenen und von W. STEINKOPF und I. SCHUBART<sup>8)</sup> modifizierten Verfahren wurde zunächst P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mit Äther bei Siedetemperatur umgesetzt, wobei unter Spaltung des Äthers ein Metaphosphorsäure-äthylester entstand. Dieser wurde durch Umfällen aus Chloroform/Äther gereinigt und in Chloroform mit Anilin zur Reaktion gebracht. Mit Äther fiel eine farblose Verbindung aus, die in den Analysenwerten mit dem aktiven Zwischenprodukt übereinstimmte. Hierdurch ist die oben angegebene Struktur des Zwischenprodukts sehr wahrscheinlich gemacht. Es war nun weiterhin zu klären, wie diese Verbindung bei der Umsetzung des Anilins mit P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in Diäthylphosphit entsteht. Aus den Versuchen von LANGHELD<sup>7)</sup>, STEINKOPF und SCHUBART<sup>8)</sup> geht hervor, daß P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> äthoxylhaltige Verbindungen unter Bildung von Metaphosphorsäure-äthylester zu spalten vermag. Es erschien daher wahrscheinlich, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mit der leicht spaltbaren Äthoxylverbindung Diäthylphosphit reagierte, wobei Metaphosphorsäure-äthylester und metaphosphorige Säure bzw. Derivate derselben entstanden.

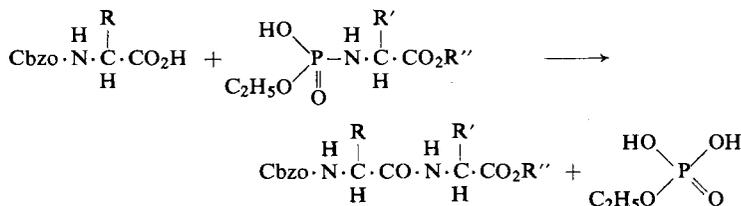
Aus Metaphosphorsäure-äthylester und Anilin kann sich, wie bereits vorstehend beschrieben, das entsprechende Anilid bilden. Wenn der angenommene Reaktionsverlauf richtig ist, müßte also bei der Einwirkung von P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> auf Diäthylphosphit sowohl Metaphosphorsäure-äthylester als auch phosphorige Säure nachweisbar sein. Um dies zu prüfen, wurde nach Auflösen von P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in Diäthylphosphit das Reaktionsgemisch mit Äther und Petroläther versetzt. Hierbei fiel ein farbloses Öl aus, das in seinen Eigenschaften mit dem nach Steinkopf und Schubart hergestellten Metaphosphorsäure-äthylester übereinstimmte.

Der Nachweis der phosphorigen Säure gelang nur indirekt. Die Lösung von P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in Diäthylphosphit wurde im Vakuum destilliert, das Destillat enthielt nur Diäthylphosphit vom Sdp.<sub>1,5</sub> 48°, Tetraäthylpyrophosphit vom Sdp.<sub>1,5</sub> 80° trat nicht auf. Gegen Ende der Destillation bildeten sich größere Mengen an Phosphin. Im Destillationskolben blieb ein schwach gelbliches Öl zurück, das sich schließlich unter Rotfärbung zersetzte. Das Zersetzungsprodukt löste sich in Wasser bis auf einen festen Rückstand, der weder in Wasser, noch in den üblichen organischen Lösungsmitteln, einschließlich Schwefelkohlenstoff, löslich war und einen intensiven Phosphingeruch aufwies. Die Analyse ergab einen extrem hohen Phosphorgehalt (76 %). Die Substanz schmolz bis zu 300° nicht. Durch Erhitzen auf 320°/1 Torr konnte aus ihr farbloser Phosphor abdestilliert werden. Der gelbrote Festkörper scheint nach allen aufgeführten Eigenschaften ein Gemisch aus festem, polymerem Phosphit und Phosphor zu sein. Beide Substanzen sind als Zersetzungsprodukte des bei der Disproportionierung der phosphorigen Säure entstehenden Phosphorwasserstoffs bekannt.

<sup>7)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 44, 2078, 2080 [1911].

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. Chem. 424, 19 [1921].

Ein Kontrollversuch zeigte, daß das als Lösungsmittel verwandte Diäthylphosphit unter den angegebenen Bedingungen unzersetzt und, ohne einen Rückstand zu hinterlassen, verdampft. Der beim Hauptversuch beobachtete Destillationsrückstand kann also nur durch das zugegebene  $P_2O_5$  verursacht worden sein. Dadurch ist bewiesen, daß  $P_2O_5$  mit Diäthylphosphit reagiert und phosphorige Säure oder deren Derivate in Freiheit setzt. Insgesamt stützen alle Beobachtungen den oben angegebenen Reaktionsverlauf. In der ersten Stufe bildet sich aus  $P_2O_5$  und Diäthylphosphit Metaphosphorsäure-äthylester. Dieser reagiert dann mit der Aminogruppe der einen Peptidkomponente zu einem Phosphorsäureester-amid, das sich seinerseits unter Abspaltung von Phosphorsäure-äthylester mit der Carboxylgruppe der anderen Peptidkomponente weiter umsetzt:



Zu dem vorgeschlagenen Reaktionsschema ist noch folgendes zu bemerken: Der Phosphorsäureester steht vor seiner Addition an die Aminogruppe auf der Hydratationsstufe des Metaphosphorsäureesters und wird im Verlauf der Reaktion als Orthophosphorsäureester wieder abgespalten. Es wird also in der Bilanz das Mol. Wasser aufgenommen, das bei der Bildung der Peptidbindung abgespalten wird. Das obige Schema enthält insofern eine Vereinfachung, als der Metaphosphorsäure-äthylester im allgemeinen nicht monomer, sondern als Gemisch polymerer Metaphosphorsäureester vorkommt. Inwieweit dies auch bei dem aus  $P_2O_5$  und Diäthylphosphit entstandenen Metaphosphorsäure-äthylester der Fall ist, wurde nicht untersucht.

Auf Grund dieser Erkenntnisse läßt sich die Peptidsynthese in gewisser Hinsicht variieren. Man kann durch Reaktion von  $P_2O_5$  mit geeigneten äthoxylhaltigen Lösungsmitteln zunächst den Metaphosphorsäure-äthylester herstellen und diesen dann in einem anderen Lösungsmittel mit der Aminokomponente reagieren lassen. Dieses Reaktionsprodukt kann dann, entweder direkt oder nach einer Zwischenreinigung, mit einer geeigneten carboxylhaltigen Verbindung umgesetzt werden. Einige Beispiele für diese Art der Durchführung sind im Versuchsteil angegeben. Welcher Weg im einzelnen vorzuziehen ist, hängt von der Natur der gewählten Ausgangskomponente ab.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Bei dem verwendeten Diphosphorpentoxyd handelt es sich um ein Präparat „p. a.“ der Fa. Merck. Präparate von geringerem Reinheitsgrad (z. B. Diphosphorpentoxyd „Albissimum Merck“) sind nicht vollständig löslich in Diäthylphosphit. Die zu Synthesen gebrauchten Mengen wurden nach Einschmelzen in vorher tarierte Glasampullen abgewogen. Bei den Synthesen in Diäthylphosphitlösung entwickeln sich zuweilen geringe Mengen Phosphorwasserstoff, es muß deshalb unter dem Abzug gearbeitet werden.

## 1. Dipeptid-Derivate

*Carbobenzoxy-glycyl-glycin-äthylester*: 1.4 g  $P_2O_5$  wurden unter schnellem Rühren und Feuchtigkeitsausschluß bei  $100^\circ$  in 7 ccm *Diäthylphosphit* gelöst. Zur farbl. klaren Lösung wurden nacheinander 6.5 ccm (0.035 Mol) Tri-n-butylamin und 1.4 g (0.01 Mol) *Glycin-äthylester-hydrochlorid* gegeben. Nach etwa 10 Min. hatte sich dieses gelöst, und es wurden 2.1 g (0.01 Mol) *Cbzo-Glycin* eingetragen, das sofort in Lösung ging. Die Reaktionslösung wurde 3 Stdn. unter ständigem Rühren bei  $100^\circ$  gehalten und anschließend auf Zimmertemp. abgekühlt. Nach Eingießen in 60 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung kristallisierte der *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* nach etwa 1stdg. Aufbewahren bei  $-15^\circ$ . Aus der hydrogencarbonathaltigen Mutterlauge konnte durch Extraktion mit Essigester noch eine Restfraktion gewonnen werden; beide wurden aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 2.45 g (83% d. Th.). Schmp.  $81^\circ$ .

$C_{14}H_{18}N_2O_5$  (294.3) Ber. N 9.5 Cbzo 45.9 Gef. N 9.2 Cbzo 41.0

Der Prozentgehalt an Cbzo-Rest wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt<sup>9)</sup>.

*Carbobenzoxy-glycyl-glycin*: 0.5 g *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* wurden nach und nach unter Umschütteln in 10 ccm siedende, gesätt. Natriumcarbonatlösung eingetragen. Nach 15 Min. hatte sich alles gelöst; es wurde noch 15 Min. weiter erhitzt, dann auf Zimmertemp. abgekühlt und unter Eiskühlung mit halbkonz. Salzsäure angesäuert. Das ausfallende *Cbzo-Gly-Gly* wurde abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen. Ausb. 0.275 g (60% d. Th.). Schmp.  $178^\circ$ .

$C_{12}H_{14}N_2O_5$  (266.3) Ber. N 10.5 Cbzo 50.7 Gef. N 10.0 Cbzo 46.0

*Cbzo-Glycin-anilid*: 2.8 g (0.02 Mol)  $P_2O_5$ , 14 ccm *Diäthylphosphit*, 2.2 ccm (0.02 Mol) *Anilin*, 4.2 g (0.02 Mol) *Cbzo-Glycin* und 6 ccm (0.03 Mol) Tri-n-butylamin wurden, wie bei *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* beschrieben, umgesetzt. Ausb. 4.1 g (72% d. Th.). Schmp.  $144^\circ$ .

$C_{16}H_{16}N_2O_3$  (284.3) Ber. N 9.8 Gef. N 9.45

*Cbzo-DL-Alanyl-glycin-äthylester*: Zu einer Lösung von 2.3 g  $P_2O_5$  in 16 ccm *Diäthylphosphit* wurden unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß 11 ccm Tri-n-butylamin bei  $100^\circ$  zugefügt. Dann wurden hintereinander 2.3 g *Glycin-äthylester-hydrochlorid* und 3.4 g *Cbzo-DL-Alanin* zugesetzt. Es wurde noch 2 Stdn. weiter erhitzt und 2.5 Stdn. bei Zimmertemp. stehengelassen. Anschließend wurde aus einem Ölbad von  $120^\circ$  bei 12 Torr etwa  $\frac{1}{3}$  des Lösungsvolumens abdestilliert und das eingeengte Reaktionsgemisch nach Abkühlen auf Zimmertemp. in 80 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung eingegossen; nach Zusatz von 1 g festem Natriumcarbonat kristallisierte das Reaktionsprodukt in der Tiefkühltruhe bei  $-15^\circ$ . Es wurde abgesaugt und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Ausb. 4.15 g (81% d. Th.). Schmp.  $85^\circ$ .

$C_{15}H_{20}N_2O_5$  (308.3) Ber. N 9.1 Cbzo 43.8 Gef. N 9.0 Cbzo 43.0

<sup>9)</sup> I. LEUBE, H. RESTLE und M. WIEDEMANN, Z. Naturforsch. **9b**, 186 [1954].

*Cbzo-Glycyl-L-leucin-äthylester*: 16 ccm *Diäthylphosphit*, 2,8 g (0.02 Mol)  $P_2O_5$ , 14 ccm (0.07 Mol) Tri-n-butylamin, 4 g (0.02 Mol) *L-Leucin-äthylester-hydrochlorid*, 4 g (0.02 Mol) *Cbzo-Glycin* wurden, wie bei *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* beschrieben, umgesetzt. Der *Cbzo-Glycyl-L-leucin-äthylester* fiel beim Zugeben der gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung ölig aus. Er wurde mit Essigester aus der wäßrig-hydrogencarbonatalkalischen Reaktionslösung ausgeschüttelt. Der Essigesterextrakt wurde nacheinander mit jeweils 10 ccm 2 n HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und dest. Wasser gewaschen. Der als Verdampfungsrückstand des Essigesterextraktes resultierende, ölige *Cbzo-Peptidester* (6.5 g) kristallisierte nicht. Zur Charakterisierung diente das *Cbzo-Peptid* und das *Peptid-äthylester-hydrobromid*, die beide gut kristallisierten.

*Cbzo-Glycyl-L-leucin*: 6.5 g des vorstehenden öligen Esters wurden mit einem sehr schnell laufenden Turborührer in 70 ccm siedender gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung dispergiert. Bei weiterem  $1\frac{1}{2}$  stdg. Rühren bei  $100^\circ$  wurde das verdampfende Wasser laufend nachgefüllt. Der Ester ging in dieser Zeit in Lösung, danach wurde auf Zimmertemp. abgekühlt. Die Lösung wurde mit wenig Aktivkohle geklärt, nach dem Filtrieren auf  $0^\circ$  abgekühlt und mit halbkonz. Salzsäure bis  $p_H$  3 angesäuert. Das ausfallende krist. *Cbzo-Gly-L-Leu* wurde nach 12 stdg. Stehenlassen bei  $12^\circ$  abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen.

Gesamtausb. 3.55 g (56% d. Th., bez. auf *L-Leucin-äthylester-hydrochlorid*). Schmp.  $104^\circ$ .

$C_{16}H_{22}N_2O_5$  (322.4) Ber. N 8.7 Cbzo 42.0 Gef. N 8.5 Cbzo 41.5

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-8.4^\circ$  (11-proz. äthanol. Lösung).

*Glycyl-L-leucin-äthylester-hydrobromid*: 3.4 g *Cbzo-Gly-L-Leu-Äthylester* wurden nach ANDERSON und Mitarbb.<sup>3c)</sup> mit *Bromwasserstoff* in Eisessig umgesetzt. *Gly-L-Leu-Äthylester-hydrobromid* kristallisierte bei Zugabe von 100 ccm absol. Äther zur Reaktionslösung und war nach 1 maligem Umkristallisieren aus Äthanol/Äther analysenrein.

Ausb. 1.8 g (60% d. Th.). Lange Nadeln vom Schmp.  $178^\circ$ .

$C_{10}H_{20}N_2O_3 \cdot HBr$  (297.2) Ber. N 9.45 Gef. N 9.55

$[\alpha]_D^{27}$ :  $-36.3 \pm 0.5^\circ$  (6-proz. äthanol. Lösung).

*Cbzo-L-Phenylalanyl-glycin-äthylester*: 0.7 g  $P_2O_5$ , 4 ccm *Diäthylphosphit*, 3.2 ccm (0.03 Mol) Tri-n-butylamin, 0.52 g *Glycin-äthylester-hydrochlorid* und 1.5 g *Cbzo-L-Phenylalanin* wurden, wie beim *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* beschrieben, umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug hier 1 Stde. Ausb. 1.166 g (60% d. Th.). Schmp.  $108^\circ$ .

$C_{21}H_{24}N_2O_5$  (384.4) Ber. N 7.3 Gef. N 7.05

## 2. Tripeptid-Derivate

*Cbzo-DL-Ala-Gly-Gly-Äthylester*: 8 ccm *Diäthylphosphit* wurden mit 1.4 g (0.01 Mol)  $P_2O_5$  auf siedendem Wasserbad etwa 15 Min. gerührt. Der entstandenen klaren Lösung wurde nun eine  $40^\circ$  warme Suspension von 2.6 g (0.01 Mol) *Gly-Gly-Äthylester-hydrochlorid* in 5.5 ccm (0.03 Mol) Tributylamin zugefügt. Nach 3 Min. wurden 2.2 g (0.01 Mol) *Cbzo-Ala* eingetragen, dann rührte man noch 3 Stdn. bei  $100^\circ$ . Aus der entstandenen schwach gelblichen Lösung kristallisierte der *Cbzo-DL-Ala-Gly-Gly-Äthylester* nach Zufügen von 60 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und  $1\frac{1}{2}$  stdg. Aufbewahren bei  $-15^\circ$ . Nach weiteren 12 Stdn. wurde bei  $+4^\circ$  abfiltriert und in wenig Eiswasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Durch Extraktion der hydrogencarbonatalkalischen Mutterlauge mit Essigester, Einengen des mit Natriumsulfat getrockneten Extrakts i. Vak. und Fälln mit Äther/Petroläther-Gemisch konnte noch weiterer *Cbzo-Ala-Gly-Gly-Äthylester* (10–15%

der Gesamtausbeute) in analysenreinem Zustand erhalten werden. Ausb. 2.9 g (79% d. Th.). Schmp. 113°.

$C_{17}H_{23}N_3O_6$  (365.4) Ber. N 11.5 Cbz 37.0 Gef. N 11.7 Cbz 39.5

Die Synthese verlief mit etwa gleicher Ausbeute, wenn die Reaktionspartner zunächst bei 100° vermischt und dann 40 Stdn. bei Zimmertemp. belassen wurden.

*Cbz-Glycyl-glycyl-glycin-äthylester*: Die Reaktion wurde wie beim Ala-Gly-Gly-Äthylester bei 100° durchgeführt. Der Ansatz war 0.01 molar. Ausb. 2.7 g (77% d. Th.). Schmp. 156°.

$C_{16}H_{21}N_3O_6$  (351.4) Ber. N 11.9 Cbz 38.5 Gef. N 11.52 Cbz 36.4

*Cbz-Gly-L-Leu-Gly-Äthylester*: Der Lösung von 3.6 g (0.0042 Mol)  $P_2O_5$  in 3.4 ccm *Diäthylphosphit* wurden nacheinander 0.6 g (0.05 Mol + 20% Überschub) *Glycin-äthylester*, 1.68 ccm (0.09 Mol) Tri-n-butylamin und 1.35 g *Cbz-Gly-L-Leu* zugegeben. Nach 3–4 stdg. Reaktionszeit bei 100° und 36 stdg. Aufbewahren bei Zimmertemp. wurde die Reaktionslösung mit 35 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, wobei der zunächst ölig ausfallende *Cbz-Gly-L-Leu-Gly-Äthylester* in der Tiefkühltruhe kristallisierte; er wurde nach 12 stdg. Stehenlassen bei +4° abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen. Ausb. 1.05 g (63% d. Th.). Schmp. 105°.

$C_{20}H_{29}N_3O_6$  (407.5) Ber. N 10.6 Cbz 33.1 Gef. N 10.4 Cbz 36.0

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-31.8 \pm 0.5^\circ$  (in 6.9-proz. Äthanol).

### 3. Hexapeptid-Derivat

*Cbz-DL-Ala-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly-Äthylester*: 3.2 ccm *Diäthylphosphit*, 0.6 g  $P_2O_5$ , 1.2 ccm Tri-n-butylamin, 0.6 g *Ala-Gly-Gly-Äthylester-hydrochlorid* und 0.75 g *Cbz-Ala-Gly-Gly* wurden nach dem bei der Darstellung des *Cbz-Gly-L-Leu-Gly-Äthylester-hydrobromids* beschriebenen Verfahren umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug bei 100° 20 Min., die Reaktionszeit bei Zimmertemp. 54 Stdn. Ausb. 1.28 g (30% d. Th.). Schmp. 201°.

$C_{24}H_{34}N_6O_9$  (550.6) Ber. N 15.3 Cbz 24.5 Gef. N 15.6 Cbz 27.0

### 4. Prüfung der Konstanz der optischen Aktivität

0.6383 g des, wie oben beschrieben, hergestellten *Gly-L-Leu-Äthylester-hydrobromids* wurden mit 3 ccm 6 n HCl im Einschlußrohr eingeschmolzen. Zugleich wurde ein Gemisch aus 0.1863 g *Glycin* und 0.2224 g *L-Leucin*, in derselben Menge 6 n HCl gelöst, in einem zweiten Einschlußrohr eingeschmolzen. Die Dauer der Totalhydrolyse betrug 16 Stdn., die Temp. 110°. Anschließend wurden die Drehwerte der beiden Hydrolysate gemessen. Für das aus dem Peptid freigesetzte L-Leucin ergab sich  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+11.60 \pm 0.5^\circ$ . Die Vergleichsprobe mit dem als Ausgangsmaterial verwendeten L-Leucin ergab  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+11.59 \pm 0.5^\circ$ .

Beim *Cbz-Gly-L-Leu-Gly-Äthylester* war die Arbeitsweise dieselbe wie beim *Gly-Leu-Äthylester-hydrobromid*. Die Einwaage betrug 0.53 g; für das im Totalhydrolysat enthaltene L-Leucin ergab sich  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+11.15 \pm 0.5^\circ$ .

### 5. Synthesen mit Metaphosphorsäureester

*Aktivierung von Anilin mit Metaphosphorsäure-äthylester*: Zu einer Lösung von 3 g *Metaphosphorsäure-äthylester*<sup>8)</sup> in 20 ccm Chloroform wurden 10 ccm *Anilin* gegeben. Die Lösung wurde dann 2½ Stdn. unter Rückfluß auf siedendem Wasserbad erhitzt, i. Vak. eingengt und mit absol. Äther gefällt. Das nach mehrfachem Umfällen aus Chloroform/Äther anfallende

festе, farbл. Produkt wurde im Vakuumexsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet. Ausb. 5.1 g (90% d. Th.) *Phosphorsäure-monoäthylester-monoanilid*, bez. auf Metaphosphorsäure-äthylester.

$C_8H_{12}NO_3P$  (201.2) Ber. N 7.0 P 15.4 Gef. N 7.7 P  $14.5 \pm 0.95^{10)}$

*Umsetzung des Aktivierungsproduktes aus Metaphosphorsäure-äthylester und Anilin mit Carbobenzoxy-glycin zu Cbzo-Gly-Anilid:* 4 g Cbzo-Gly wurden zu einer Lösung von 5.1 g (25% Überschuß) des aktivierten Anilins in 15 ccm Chloroform zugefügt. Dann wurde  $3\frac{1}{2}$  Stdn. unter Rückfluß gekocht und nach Abkühlen auf Zimmertemp. das Chloroform i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wurde nach Zusatz von 45 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung in Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung nacheinander mit je 15 ccm 2 n HCl und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Aus der i. Vak. eingengten Essigesterlösung wurde das *Cbzo-Gly-Anilid* durch Zugabe von Äther/Petroläther-Gemisch krist. gewonnen. Ausb. 2.9 g (53% d. Th.). Schmp. 143°.

$C_{16}H_{16}N_2O_3$  (284.3) Ber. N 9.9 Gef. N 9.4

*Cbzo-Gly-Gly-Äthylester:* 0.65 g (0.0063 Mol) *Gly-Äthylester* und 1.32 g (0.0063 Mol) *Cbzo-Gly* wurden unter Kühlung zu 5 ccm einer 1g *Metaphosphorsäure-äthylester* enthaltenden Chloroformlösung gegeben. Die zunächst entstandene Suspension klärte sich rasch auf dem siedenden Wasserbad. Nach weiterem 2 stdg. Erhitzen unter Rückfluß wurde aus dem Reaktionsgemisch das Chloroform i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit 15 ccm gesätt. Hydrogencarbonatlösung aufgenommen, wobei der *Cbzo-Gly-Gly-Äthylester* auskristallisierte. Er wurde nach 12stdg. Stehenlassen bei +4° abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Ausb. 0.72 g (38% d. Th.). Schmp. 80°.

$C_{14}H_{18}N_2O_5$  (294.3) Ber. N 9.5 Cbzo 45.9 Gef. N 9.3 Cbzo 45.0

## 6. Polykondensation von Ala-Gly-Gly

47 mg *Ala-Gly-Gly*, 0.13 ccm Tri-n-butylamin und 0.17 ccm einer 20-proz. Lösung von  $P_2O_5$  in *Diäthylphosphit* wurden nacheinander in einem kleinen, mit Schliffstopfen versehenen Kölbchen gemischt. Das Peptid wurde durch  $\frac{1}{4}$  stdg. Erwärmen auf siedendem Wasserbad in Lösung gebracht und weitere 2 Stdn. bei 100° gehalten. Nach dem Abkühlen wurde das Peptidgemisch durch Ätherfällung und Umfällen aus Äthanol/Äther gereinigt und dann mit Fluordinitrobenzol umgesetzt<sup>4)</sup>. Die DNP-Derivate der Polypeptide wurden in Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) absteigend getrennt. Der Substanzgehalt der aus dem Papierchromatogramm eluierten DNP-Peptid-Banden wurde nach I. LEUBE, H. RESTLE und M. WIEDEMANN<sup>9)</sup> quantitativ bestimmt.

<sup>10)</sup> C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. biol. Chemistry 66, 375 [1925].