

erwärmt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde vom entstandenen *Trichloracetamid* (21 g, 63% d. Th.) abfiltriert und mit Benzol nachgewaschen. Die benzol. Lösung wurde 2mal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt und anschließend das restliche Trichloracetamid durch Schütteln mit 2 *n* NaOH entfernt. Nach Waschen und Trocknen der benzol. Lösung wurde abgedampft und fraktioniert. Sdp.₁₃ 155–158°, Ausb. 9.2 g (46% d. Th.).

$C_8H_{11}O_4P$ (202.2) Ber. P 15.32 OCH₃ 30.64 Gef. P 15.13 OCH₃ 30.17

Zur Isolierung evtl. entstandenen Methylphenylphosphats wurde der Hydrogencarbonatauszug angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach Entfernen des Äthers blieb ein öliges Rückstand, der beim Animpfen mit Monophenylphosphat durchkristallisierte. Die Substanz (2.3 g, Schmp. 95–97°) zeigte keine Schmelzpunktsdepression mit Monophenylphosphat.

Säure und Imidoester im Verhältnis 1:1: 17.4 g (0.1 Mol) *Monophenylphosphat* und 17.6 g (0.1 Mol) *Methyl-trichloracetimidat* wurden in 50 ccm Acetonitril gelöst und 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die Aufarbeitung wie oben ergab 4.1 g *Dimethyl-phenyl-phosphat* (18% d. Th., bez. auf eingesetzte Säure bzw. 36% d. Th., bez. auf Imidoester). Aus dem Hydrogencarbonatauszug konnten 8.1 g Monophenylphosphat zurückgewonnen werden.

β) *Phosphorsäure-phenylester-bis-β-methoxyäthylester (VIk)*: 17.4 g *Monophenylphosphat* und 44.1 g *β-Methoxyäthyl-trichloracetimidat* wurden in 80 ccm Acetonitril gelöst und 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die übliche Aufarbeitung ergab nach 3maliger Fraktionierung das reine tert. Phosphat. Ausb. 16.2 g (56% d. Th.), Sdp._{0.1} 140–141°.

$C_{12}H_{17}O_6P$ (290.3) Ber. P 10.67 Gef. P 10.51

FRIEDRICH CRAMER und KLAUS-GÜNTHER GÄRTNER

Zur Chemie der „energiereichen Phosphate“, V ¹⁾

Peptidsynthese über Phosphorsäure-aminosäure-anhydride

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 5. Mai 1958)

Aus Enolphosphaten und *N*-geschützten Aminosäuren werden Phosphorsäure-aminosäure-anhydride dargestellt, deren Umsetzung mit Aminosäuren bzw. Peptiden zu Di- und höheren Peptiden führt.

Nach neueren biochemischen Untersuchungen verläuft die biologische Peptidsynthese über gemischte Anhydride zwischen Aminosäuren und Adenosin-5'-monophosphorsäure^{2,3)}. Bei dieser Aminosäure-Aktivierung reagiert eine Aminosäure mit

¹⁾ IV. Mitteil.: F. CRAMER und H. HETTLER, Chem. Ber. **91**, 1181 [1958].

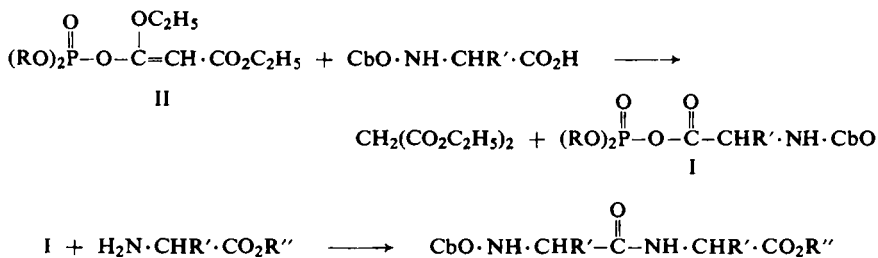
²⁾ P. BERG, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3163 [1955]; M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER und P. C. ZAMECNIK, J. biol. Chemistry **218**, 345 [1956]; M. B. HOAGLAND, P. C. ZAMECNIK, N. SHARON, F. LIPMANN, M. P. STULBERG und P. O. BOYER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 215 [1957]; A. MICHELSON, Nature [London] **181**, 375 [1958]; K. OGATA und H. NOHARA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **25**, 659 [1957].

³⁾ V. V. KONINGSBERGER, CHR. O. VAN DER GRINTEN und J. TH. G. OVERBEEK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 483 [1957].

ATP*) zum AMP-Aminosäure-anhydrid und anorganischem Pyrophosphat. In den Folgereaktionen wird die an der Carboxylgruppe aktivierte Aminosäure wahrscheinlich von Ribonucleinsäure-Bausteinen übernommen und von dort an Peptide bzw. Proteine angebaut. Ribonucleinsäure oder Nucleotide wirken dabei also als Überträger („vehicle“)³⁾. Wir haben versucht, gemischte Anhydride zwischen substituierten Phosphorsäuren und Aminosäuren darzustellen und sie in Modellreaktionen zur Synthese von Peptiden zu verwenden.

Anhydride zwischen Aminosäuren und Phosphorsäuren (= I) wurden bereits mehrfach dargestellt. Nach H. CHANTRENNE⁴⁾ erhält man I durch Umsetzung von CbO-Aminosäurechlorid**) mit dem Silbersalz der Phenylphosphorsäure. Einen ähnlichen Weg beschritt J. C. SHEEHAN⁵⁾, der Phthalylglycyl-chlorid mit dem Silbersalz der Dibenzylphosphorsäure kuppelte. In Umkehrung dieses Verfahrens gingen A. KATCHALSKY und M. PAECHT⁶⁾ vom Silbersalz der Aminosäure und Dibenzylphosphorsäure-chlorid aus. TH. WIELAND⁷⁾ verwendete Monophenylphosphorsäure-dichlorid bzw. Thiophenylester von Aminosäuren⁷⁾, und A. W. D. AVISON⁸⁾ benützte den Austausch von Acylgruppen in Anhydriden. Besonders die letzte Darstellungsweise weist auf den Nachteil aller Methoden hin: Die basenkatalysierte Disproportionierung in symmetrische Anhydride. Die so dargestellten Anhydride I, die allerdings nicht in vollständiger Reinheit erhältlich waren, reagierten mit Aminosäuren zu Dipeptiden; die Methode stellt im Prinzip eine Abwandlung der „Anhydrid-Methode“⁹⁾ dar.

Zum Knüpfen der Peptidbindung bot sich nun eine Reaktion an, die wir bereits früher bei Arbeiten über die Umsetzung von Enolphosphaten mit Carbonsäuren und Phenolen gefunden hatten und bei der die Gefahr der Disproportionierung weitgehend vermieden wird¹⁰⁾: Phosphorsäure-diäthylester-[α -äthoxy- β -carbäthoxy-vinylester] (II, R = C₂H₅) setzt sich mit CbO-Aminosäuren zum gemischten Anhydrid I (R = C₂H₅; R' = H, Alkyl oder Aryl) um, welches, ohne isoliert zu werden, mit Estern oder Natriumsalzen weiterer Aminosäuren zu Di- bzw. höheren Peptiden reagiert.



*) AMP = Adenosin-5'-monophosphat, ATP = Adenosin-5'-triphosphat.

4) *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **4**, 484 [1950].

5) J. C. SHEEHAN und V. S. FRANK, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 1312 [1950].

***) CbO = Carbobenzyoxy.

6) *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 6042 [1954].

7) a) TH. WIELAND und H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 [1951]; b) TH. WIELAND, E. NIEMANN und G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **68**, 305 [1956].

8) *J. chem. Soc. [London]* **1955**, 732.

9) Neuere Übersichten s. a) TH. WIELAND und B. HEINKE, *Angew. Chem.* **69**, 362 [1957]; b) W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* [Wien] **13**, 444 [1956]; c) M. GOODMAN und G. W. KENNER, *Advances Protein Chem.* **12**, 465 [1957].

10) F. CRAMER und K. G. GÄRTNER, *Chem. Ber.* **91**, 704 [1958]; s. auch vorläufige Mitteil.: F. CRAMER und K. G. GÄRTNER, *Chem. and Ind.* **1958**, 560.

Die Reaktion wird so durchgeführt, daß man die Komponenten des ersten Reaktions schrittes (II und CbO-Aminosäure) in Aceton oder Dimethylformamid unter Ausschluß von Feuchtigkeit 24 Stdn. bei 40° stehen läßt oder 1 Stde. auf 70° erwärmt. Hierbei bildet sich I in nahezu vollständiger Ausbeute. Die Reaktionslösung gibt man sodann unter Rühren tropfenweise zu einer wäßrigen Natriumsalzlösung einer Aminosäure (p_H 8–9). Bei der Verwendung von Aminosäureestern kann man auch in Benzol arbeiten, das erste Verfahren zeichnet sich jedoch durch besondere Einfachheit aus, da man durch Ansäuern der Reaktionslösung direkt die entsprechenden CbO-Peptide als freie Säuren gewinnt, während man bei Verwendung der Ester zunächst verseifen muß — eine besonders bei höheren CbO-Peptidestern nicht immer glatt verlaufende Reaktion. Es wurden nach beiden Verfahren verschiedene Di-, Tri- und Tetrapeptide hergestellt, nämlich CbO-Glycyl-glycin, CbO-Glycyl-glycyl-glycin, CbO-Tetraglycin, CbO-Glycyl-alanin, CbO-Glycyl-DL-phenylalanin, CbO-Alanyl-alanin, CbO-Alanyl-DL-phenylalanin-äthylester, CbO-Glycyl-L-tyrosin-äthylester und CbO-L-Leucyl-glycin-äthylester.

Im Hinblick auf weitere Arbeiten zur Synthese natürlicher Peptidsequenzen wurde untersucht, ob beim Arbeiten mit optisch aktiven Aminosäuren bei unserer Synthese Racemisierungen auftreten. Hierzu wurde einerseits zur Aminolyse von I eine optisch aktive Aminosäure verwendet (L-Tyrosin-äthylester) und andererseits zur Herstellung des gemischten Anhydrides I eine optisch aktive CbO-Aminosäure (CbO-L-Leucin) eingesetzt. Bei gemischten Anhydriden besteht grundsätzlich die Gefahr der Racemisierung. Das Experiment zeigte, daß in keinem Falle eine Racemisierung der Aminosäure stattfindet. Die Reaktion mit L-Tyrosinester führte mit 80-proz. Ausbeute zum entsprechenden Dipeptidester, dessen Drehung 18.3° betrug (Lit.: 18–19°). Bei der Umsetzung von II mit CbO-L-Leucin und anschließender Aminolyse mit Glycinester erhielten wir das Dipeptid in 63-proz. Ausbeute mit einem $[\alpha]_D$ von -27° (Lit.: -25 bis -27°).

Bei der Darstellung von I werden nach unserem Verfahren die freien Carbonsäuren zur Reaktion gebracht; es wäre daher im Prinzip denkbar, die Aminogruppe statt durch die CbO-Gruppe durch Salzbildung etwa mit Benzolsulfonsäure zu schützen. Entsprechende Phosphorsäure-aminosäure-anhydride bzw. deren benzolsulfonsaure Salze sind in der Tat darstellbar. Allerdings besteht bei der anschließenden Reaktion mit der Aminogruppe der zweiten Aminosäure in wäßriger Lösung die Möglichkeit, daß die Benzolsulfonsäure mit der zweiten Aminosäure ein Salz bildet, wodurch man zu uneinheitlichen Produkten käme. Es muß daher noch geprüft werden, ob eine Peptidsynthese ohne jede Schutzgruppe nach diesem Verfahren möglich ist.

Wir danken der ROCKEFELLER-STIFTUNG, New York, und der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, Bad Godesberg, für die großzügige Unterstützung der Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Phosphorsäure-diäthylester-[α -äthoxy- β -carbäthoxy-vinylester] (II) (zur Darstellung s. I. c.¹⁰⁾) ist bei 4° monatelang haltbar und kann auch bei Zimmertemperatur längere Zeit aufbewahrt werden.

Bei den *Peptiden* sind jeweils nur ausgewählte Literaturzitate angegeben, für weitere Einzelheiten s. I. c.^{9c)}.

1. *CbO-Glycin-anilid*: 350 mg CbO-Glycin wurden mit 500 mg II gemischt und 2 ccm Aceton zugefügt. Nach 16 Stdn. bei 40° wurde mit 320 g Anilin versetzt und die Lösung im Eisschrank der Kristallisation überlassen. Nach einigen Stunden wurde vom Kristallbrei abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 295 mg (62 % d. Th.). CbO-Glycin-anilid¹¹⁾ vom Schmp. 146°.

2. *CbO-Glycyl-glycin-äthylester*: 0.7 g CbO-Glycin in 2 ccm Aceton wurden mit 1.0 g II versetzt und 24 Stdn. bei 40° gehalten. Dann wurden 0.7 g Glycinester in 4 ccm Benzol hinzugefügt (Erwärmung). Nach 1 Stde. wurde die Lösung mit verd. Salzsäure, KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt und der Ester mit Petroläther (Sdp. 60 bis 70°) ausgefällt: 700 mg CbO-Glycyl-glycin-äthylester¹²⁻¹⁴⁾ (70 % d. Th.) vom Schmp. 82°. Ein 0.01 molarer Ansatz ergab 74 % Ausbeute.

3. *CbO-Glycyl-DL-alanin-äthylester*: Ansatz 0.01 molar. Verfahren und Aufarbeitung wie unter 2. Beim Ausfällen mit Petroläther fiel der Ester als nicht kristallisierendes Öl an¹²⁾. 2.01 g (67 % d. Th.). Der Ester wurde mit 3 ccm 2*n* NaOH in 1 Stde. bei Raumtemperatur verseift. Ansäuern mit konz. Salzsäure ergab die freie Säure vom Schmp. 174° (aus wäbr. Alkohol^{12,15)}).

4. *CbO-Glycyl-DL-phenylalanin*: 1.04 g CbO-Glycin in 2 ccm Aceton und 1.48 g II wurden 1 Stde. bei 70° gehalten. Nach Erkalten versetzte man mit 2 ccm Benzol und ließ langsam in eine Lösung von 0.82 g Phenylalanin und 0.2 g NaOH in 2 ccm Wasser eintropfen. Die wäßrige Lösung war mit Phenolphthalein versetzt, und es wurde in dem Maße, in dem sich die Lösung entfärbte, 2*n* NaOH zugefügt. Nach Abtrennen der Benzolphase wurde die wäßrige Schicht vorsichtig mit konz. Salzsäure angesäuert und das CbO-Peptid aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 1.05 g (61 % d. Th.); Schmp. 160°^{12,16,17,18)}.

5. *CbO-Glycyl-glycin*: Ansatz 0.01 molar, Verfahren und Aufarbeitung wie unter 4. Ausbeute an freier Säure 82 % d. Th.; Schmp. aus Methanol/Wasser 178°^{12,19)}.

6. *CbO-Triglycin*: Ansatz 0.005 molar. Verfahren wie bei 4. Ausb. 87 % d. Th.; Schmp. (aus Wasser) 198°^{12,20)}.

11) M. BERGMANN und H. FRAENKEL-CONRAT, J. biol. Chemistry 119, 707 [1937].

12) ST. GOLDSCHMIDT und M. WICK, Liebigs Ann. Chem. 575, 217 [1952].

13) O. SÜS, Liebigs Ann. Chem. 572, 96 [1951].

14) G. W. ANDERSON und R. W. YOUNG, J. Amer. chem. Soc. 74, 5307 [1952].

15) TH. WIELAND und R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. 569, 122 [1950].

16) TH. WIELAND, W. SCHÄFER und E. BOKELMANN, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 [1951].

17) J. R. VAUGHAN JR. und R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. 74, 676 [1952].

18) ST. GOLDSCHMIDT und F. OBERMEIER, Liebigs Ann. Chem. 588, 24 [1954]; G. W. ANDERSON, J. BLODINGER und A. D. WELCHER, J. Amer. chem. Soc. 74, 5309 [1952].

19) J. I. HARRIES und T. S. WORK, Biochem. J. 46, 582 [1950].

20) A. STOLL und T. PETRZILKA, Helv. chim. Acta 35, 589 [1952].

7. *CbO-Tetraglycin*: Ansatz 0.005 molar. Durch Umsetzung des Anhydrides I ($R' = H$) mit Triglycin-Na-Salz. Verfahren und Aufarbeitung wie bei 4., 5. und 6. Ausb. 81 % d. Th.; Schmp. 228° (Zers.) (aus Wasser)²¹⁾.

8. *CbO-DL-Alanyl-DL-alanin*: Ansatz 0.005 molar. Verfahren und Aufarbeitung wie unter 4., 5. und 6. Ausb. 76 % d. Th.; Schmp. 140° (aus Methanol/Wasser)²²⁾.

9. *CbO-DL-Alanyl-DL-phenylalanin-äthylester*: 1.12 g CbO-Alanin wurden in 2 ccm Aceton gelöst und mit 1.48 g II gemischt. Nach 1 Stde. bei 70° ließ man unter Rühren in eine Suspension von 1.35 g Phenylalanin-äthylester-hydrochlorid und 2.02 g Triäthylamin in 4 ccm Benzol eintropfen. Als bald wurde mit verd. Salzsäure, $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet, eingengt und der Ester mit Petroläther ausgefällt. Ausb. 1.13 g (68 % d. Th.); Schmp. 112°²³⁾.

10. *CbO-Glycyl-L-tyrosin-äthylester*: 2.08 g II wurden mit 1.46 g CbO-Glycin in 2 ccm Aceton 1 Stde. bei 70° gehalten. Das Reaktionsgemisch ließ man danach unter Kühlung in eine Lösung von 1.27 g Tyrosin-äthylester und 0.7 g Triäthylamin in 4 ccm Essigester eintropfen. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde eingengt und mit Petroläther ausgefällt. Ausb. 2.09 g Dipeptidester (80 % d. Th.); Schmp. 126°. $[\alpha]_D^{25} + 18.3^\circ$ ($c = 5$, Äthanol)^{24,14,17,23)}.

11. *CbO-L-Leucyl-glycin-äthylester*: Ansatz 0.005 molar. CbO-L-Leucin und II wurden gemischt und 1 Stde. bei 70° gehalten. Dann ließ man in eine Lösung von Glycin-äthylester in 2 ccm Benzol unter Kühlung eintropfen. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde mit Petroläther gefällt. Ausb. 1.1 g (63 % d. Th.); Schmp. 101°. $[\alpha]_D^{25} - 27^\circ$ ($c = 5$, Äthanol)^{14,17,23,24b,25)}.

21) ST. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER, Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 [1953]; R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL und P. SIEBER, Helv. chim. Acta **39**, 872 [1956].

22) B. F. ERLANGER und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3508 [1951].

23) J. R. VAUGHAN JR. und R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 5553 [1951].

24) a) TH. WIELAND und B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 [1956]; b) R. W. YOUNG, K. H. WOOD, R. J. JOYCE und G. W. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2126 [1956].

25) J. F. ARENS, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **74**, 769 [1955].

© Verlag Chemie, GmbH. 1958

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Rudolf Criegee, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Wilhelm Merz, München. Verantwortlich für den Anzeigenteil: W. Thiel, Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage), Weinheim/Bergstr., Pappelallee 3 · Fernsprecher Sammelnummer 3635 · Fernschreiber 0465516 chemieverl wnh. Telegramm-Adresse: Chemieverlag Weinheimbergstr.

Gesetzt aus der Monotype-Times-Schrift; Druck: Buchdruckerei Dr. Alexander Krebs, Weinheim/Bergstr. Printed in Germany. Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form — durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren — ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photoprint, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. — Preis jährlich DM 190.—; Einzelheft DM 16.—. — Zahlungen an: Verlag Chemie, GmbH., Weinheim/Bergstr. — Postscheckkonten: Frankfurt a. M. Nr. 145314, Berlin-West Nr. 7430, Wien 108750, Zürich VIII 47055, Stockholm 74137. Banken: Volksbank eGmbH., Deutsche Bank A.G., Weinheim/Bergstr., Dresdner Bank A. G., Mannheim, P 2, 10/13. — Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf eines Halbjahres. Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.