

HARTMUT NIEDRICH

Aminosäure- und Peptidsemicarbazide

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der
Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

(Eingegangen am 14. April 1964)

Durch direkte Acylierung von Semicarbazid sowie durch Umsetzung von Benzoyloxycarbonylamino-säure-hydraziden mit Cyansäure wurden einige Aminosäure- und Peptidsemicarbazide, so z. B. die dem Carboxylende des Oxytocins analoge Sequenz Prolyl-leucin-semicarbazid, hergestellt. Deren Verhalten unter den Bedingungen der Peptidsynthese wird untersucht.

Von den physiologisch wirksamen Peptiden, wie Oxytocin, Bradykinin u. a., sind bis jetzt eine Vielzahl von Analogen synthetisiert und auf ihre Wirkung untersucht worden¹⁾. In fast allen Fällen wurden eine oder mehrere Aminosäuren gegen andere ausgetauscht, um aus der Wirkungsänderung Schlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Molekülbausteine am Wirkort zu ziehen und letztlich Hinweise auf Topochemie und Mechanismus am Rezeptor zu finden²⁾. Solche Variationen berühren die Peptidkette, die regelmäßig wiederkehrende Atomfolge $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$, nicht. Eine Veränderung dieser Gerüststruktur in wirksamen Peptiden ist bisher nur beschränkt durchgeführt worden. Der Einbau von *N*-Methyl-aminosäuren, z. B. die Synthese von Sarkosin³⁾ und [*N*-Methyl-tyrosin]²-Oxytocin⁴⁾, sowie eine Verlängerung der Peptidkette infolge Verknüpfung über β -Carboxylgruppen, z. B. [β -Asparagin]¹-Angiotensin⁵⁾ und Isoasparaginyloxytocin⁶⁾, sind Schritte in dieser Richtung.

Auch der Einbau von Hydrazinosäuren in Peptide⁷⁾, z. B. die Synthese von Hydrazinoacetyl⁹-Oxytocin⁸⁾, verändert die Peptidkettenstruktur. Durch die β -Verknüpfung der Hydrazinoessigsäure resultiert dabei eine Verlängerung der Kette. Baut man an Stelle der Aminosäuren Semicarbazide ein, so ist die sterische Veränderung des Peptidmoleküls weitaus geringer. Der α -Kohlenstoff wird durch Stickstoff ersetzt, es entstehen gewissermaßen α -Aza-peptide.

Derartige „peptidähnliche Oligoverbindungen“ hat GANTE⁹⁾ 1962 beschrieben.

- 1) Vgl. K. HOFMANN, *Annu. Rev. Biochem.* **31**, 213 [1962], und R. SCHWYZER, *Pure appl. Chem.* **6**, 265 [1963].
- 2) J. RUDINGER und J. KREJČI, *Experientia* [Basel] **18**, 585 [1962].
- 3) W. D. CASH, V. DU VIGNEAUD und Mitarbb., *J. med. pharmac. Chem.* **5**, 413 [1962].
- 4) R. L. HUGUENIN und R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **44**, 213 [1961].
- 5) B. RINIKER, H. BRUNNER und R. SCHWYZER, *Angew. Chem.* **74**, 469 [1962]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **1**, 405 [1962].
- 6) W. B. LUTZ, C. H. RESSLER, D. E. NETTLETON und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 167 [1959].
- 7) W. KNOBLOCH und H. NIEDRICH, *J. prakt. Chem.* **17**, 263, 273 [1962]; H. NIEDRICH, *Chem. Ber.* **96**, 2774 [1963].
- 8) H. NIEDRICH, B. WIEGERSHAUSEN und E. GÖRES, *Proc. of the Second Pharmac. Meeting, Sympos. X*, S. 173, Pergamon Press, Oxford 1964.
- 9) J. GANTE, *Dissertat.* Berlin 1962.

Durch Reaktion von geschützten Aminosäurehydraziden mit *N*-Carbonyl-aminosäureestern stellte er Peptide her, die in der Kette Semicarbazyl- statt Glycyl- enthalten, so z. B. ein Octaglycyl-Analoges, in dem Semicarbazid und Glycin alternieren. Ausgehend von Benzyl-oxycarbonylhydrazin, sind auf diese Weise Heteropeptide mit *N*-terminalem Semicarbazid erhalten worden. Die Umwandlung der α -Aza-peptide in die Hydrazide und die Abspaltung des Z-Restes mit HBr/Eisessig gelangen ohne Schwierigkeiten, die Acylierung eines Semicarbazides nach der Anhydrid-Methode ergab eine unbefriedigende Ausbeute.

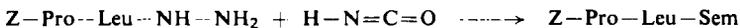
Das erste und bisher einzige Analoge eines wirksamen Peptides mit einer solchen „isosteren Einheit innerhalb der Polyamidkette“, das $[\alpha$ -Aza-valyl]⁹-Angiotensin II, haben H.-J. Hess und Mitarbb.¹⁰⁾ dargestellt. Sie setzten dabei *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*N'*-isopropylhydrazin mit *N*-Carbonyl-*O*-benzyl-tyrosin-äthylester um und kondensierten das nach HCl-Behandlung erhaltene freie Hydrazid mit Z-Nitroarginin nach der DCCI-Methode¹¹⁾. Z-Abspaltung mit HBr/Eisessig, Pd-Kohle/H₂ sowie die alkalische Verseifung der α -Aza-peptide wurden ebenfalls, allerdings ohne Angabe von Ausbeuten, durchgeführt.

Für die Synthese von α -Aza-peptiden mit C-terminalem Semicarbazid gibt es zwei Wege: 1. Die direkte Acylierung von Semicarbazid, 2. die Umsetzung von geschützten Aminosäurehydraziden mit Cyansäure. Tab. 1 enthält die Ergebnisse der Acylierung.

Tab. 1. Durch direkte Acylierung von Semicarbazid hergestellte Aminosäure-semicarbazide

Methode	Verbindung	Reinausb. (%)
Dicyclohexylcarbodiimid-	Z—Leu—Sem	26
<i>p</i> -Nitrophenylester-	Z—Leu—Sem	29
Anhydrid-	Z—Leu—Sem	41
Azid-	Z—Gly—Sem	0

Die Umsetzung des Hydrazids in Salzsäure mit Kaliumcyanat verläuft im Falle des Z—Gly—Sem erfolgreich nach der von H. GEHLEN¹²⁾ für das Phenylessigsäure-semicarbazid gegebenen Vorschrift. Die veränderten Löslichkeitsverhältnisse erfordern für die Darstellung von Z—Leu—Sem und Z—Pro—Leu—Sem eine besondere Methodik. Die Reaktion ist in wäßriger, heterogener Phase weitaus ergiebiger als in Dimethylformamid/Eisessig, dem günstigsten der erprobten Lösungsmittelgemische.



Z—Pro—Leu—OCH₃ wurde nach der Nitrophenylester-Methode¹³⁾ mit 85% und daraus das Hydrazid mit 90% Ausbeute gewonnen.

Durch Hydrierung an Palladiumkohle ließ sich die Z-Schutzgruppe nur vom Z—Gly—Sem entfernen. Die mit HBr/Eisessig freigesetzten Aminoacyl-semicarbazidhydrobromide haben einen undefinierten HBr-Gehalt. Während mit Z—Pro-[*p*-nitrophenylester] keine Acylierung von Leu—Sem möglich war, gelang sie mit Z-Glycinazid beim Gly—Sem und beim Pro—Leu—Sem.

Geschützte Peptide können also mit Aminoacyl-semicarbaziden nach der Azid-Methode verknüpft werden.

¹⁰⁾ H.-J. HESS, W. T. MORELAND und G. D. LAUBACH, J. Amer. chem. Soc. **85**, 4040 [1963].

¹¹⁾ Abkürzungen: Z = Benzyloxycarbonyl, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, Sem steht für —NH—NH—CO—NH₂.

¹²⁾ Liebigs Ann. Chem. **563**, 185 [1949].

¹³⁾ M. BODANSZKY und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 [1959].

Tab. 2. Synthetisierte Aminosäure- und Peptidsemicarbazide
 $X-[NH-CHR-CO]_n-NH-NH-CO-NH_2$

X	$-[NH-CHR-CO]_n-$	Ausb. (%)	Schmp.
Z-	-Gly-	85	188—190°
Z-	-Leu-	59	144—146°
Z-	-Pro-Leu-	58	212—213°
Z-	-Gly-Gly-	87	190—193°
Z-	-Gly-Pro-Leu-	63	230—232°
H-	-Gly- (Hydrochlorid)	78	183—185°
H-	-Leu- (Acetat)	78	135—138°
H-	-Pro-Leu- (Hydrobromid)	>90	hygroskopisch

Da die Synthese von Oxytocinanalogen als letzten Reaktionsschritt eine Spaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak erfordert, wurde das Verhalten von Z—Leu—Sem gegen Na/NH₃ untersucht. Vgl. dazu I. c.¹⁴⁾ Wenn unter absolutem Feuchtigkeitsausschluß das Natrium in NH₃ gelöst in den Reaktionskolben eingebracht wird, finden keine Spaltungsreaktionen am Semicarbazid statt, wie dünnschichtchromatographisch nachgewiesen wurde. Zur Gewinnung einer Lösung von Na in NH₃ wurde in Anlehnung an die von NESVADBA entwickelte Apparatur¹⁵⁾ eine vereinfachte Anordnung benutzt (siehe experimentellen Teil). Ein Zusatz von Acetamid verhindert die mitunter auftretende geringfügige Abspaltung von Leu vollständig. Bei der anschließenden Isolierung des Leu—Sem durch Adsorption an Dowex 50 X 12 (H-Form) und Elution mit *n* NH₃ kommt es zur teilweisen Spaltung.

Das Verhalten der Aminoacyl-semicarbazide unter den Bedingungen der Peptidsynthese gibt die Grundlage für die Synthese weiterer α -Aza-peptide.

Für anregende Diskussionen sei Dr. J. RUDINGER vielmals gedankt. Die Mikroanalysen wurden in unserem analytischen Labor durch F. KNOBLOCH und N. SMIRNOWA ausgeführt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach BOËTIUS bestimmt und sind korrigiert. Die Dünnschichtchromatographie der Aminoacylsemicarbazide erfolgte an Kieselgel G mit Isopropylalkohol/Wasser (2:1) (System A) und *n*-Butanol/Ameisensäure/Wasser (75:15:10) (System B). Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrin und ammoniakal. Silbernitratlösung besprüht. Die Analysenproben wurden bei 80°/0.05 Torr 6 Stdn. getrocknet.

Benzoyloxycarbonyl-glycin-semicarbazid: 8.00 g *Benzoyloxycarbonyl-glycinhydrazid* werden in 50 ccm 2 *n* HCl gelöst. Nach Filtrieren wird unter Rühren portionsweise eine Lösung von 6.00 g *Kaliumcyanat* in 20 ccm Wasser hinzugegeben, bis die Lösung schwach alkalisch reagiert, wobei das Gemisch stark schäumt (Abzug). Durch Zugabe weiterer Salzsäure wird auf pH 3 eingestellt. Nach kurzer Zeit kristallisiert das *Semicarbazid* aus. Ausb. 8.12 g (85%), aus Wasser Schmp. 188—190°. Weitere Umkristallisation aus Wasser ist verlustreich.

C₁₁H₁₄N₄O₄ (266.3) Ber. C 49.62 H 5.30 N 21.04 Gef. C 49.59 H 5.50 N 20.99

¹⁴⁾ S. BAJUSZ und K. MEDZIHRADESKY, in V. Europ. Peptidsymposium, S. 49, Pergamon Press Oxford 1963.

¹⁵⁾ Unveröffentlicht.

Versuch zur direkten Acylierung von Semicarbazid nach der Azid-Methode: Zu dem aus 2.24 g *Z-Glycinhydrasid* bereiteten *Azid* (vgl. Synth. von $Z\text{-Gly-Gly-NH-NH-CO-NH}_2$) wird eine mit Triäthylamin auf pH 6.5–7 neutralisierte Lösung von 1.5 g *Semicarbazidhydrochlorid* gegeben. Der nach 24 Stdn. im Kühlschrank ausgeschiedene Triäthylaminhydrochlorid-Niederschlag enthält einen wasserunlöslichen Anteil, Schmp. 68–69°, der sich bei der Aufarbeitung unter Gasentwicklung zersetzt. Aus dem Filtrat wird nur *Z-Glycinamid* (0.5 g, Schmp. 134–136°) erhalten.

Glycin-semicarbazid-hydrochlorid: 2.20 g *Benzyloxycarbonyl-glycin-semicarbazid* in 100 ccm Methanol werden unter Zusatz von 4.4 ccm 2 *n* HCl und ca. 200 mg 10-proz. Palladiumkohle hydriert. Man löst den nach Eindampfen der filtrierten Lösung i. Vak. erhaltenen Rückstand in 6 ccm Wasser, filtriert und versetzt mit 40 ccm Methanol und 40 ccm Äther. Ausb. 1.08 g (78%), Schmp. 183–185°. Reinigung erfolgt durch Lösen in Wasser und Fällern mit Äthanol. R_F (System A) 0.55, R_F (B) 0.14.

$C_3H_9N_4O_2]Cl$ (168.6) Ber. C 21.37 H 5.38 N 33.23 Gef. C 21.74 H 5.31 N 33.34

Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycin-semicarbazid nach der Azid-Methode: 1.12 g (5.00 mMol) *Benzyloxycarbonyl-glycinhydrasid* werden unter Zusatz von 2.5 ccm konz. Salzsäure in 10 ccm Dimethylformamid gelöst. Unter Rühren tropft man bei –15° innerhalb von 2 Min. 1.5 ccm 25-proz. *Natriumnitrit*-Lösung hinzu. Das *Azid* scheidet sich aus. Man gibt Wasser hinzu, bis sich der Brei gut durchrühren läßt, und stellt nach 5 Min. mit Triäthylamin auf pH 6.5–7 ein. Eine auf –10° vorgekühlte Lösung, die 0.84 g *Glycin-semicarbazid-hydrochlorid*, 0.69 ccm Triäthylamin und 2.5 ccm Wasser in 5 ccm DMF enthält, wird hinzugefügt. Die Mischung rührt man noch 30–40 Min. bei –10° und stellt über Nacht in den Kühlschrank (0–4°). Vom ausgeschiedenen Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt, das Filtrat in 50 ccm Wasser, das etwas HCl enthält, gegossen und mit Ammoniaklösung auf pH 7 eingestellt. Nachdem i. Vak. alles Lösungsmittel entfernt ist, wird in Wasser gelöst und auf pH 2.5 angesäuert. Über Nacht im Kühlschrank scheiden sich 1.41 g (87%) des *Peptid-semicarbazids* aus. Schmp. 190–193°. Die Analysenprobe wurde aus Wasser umkristallisiert.

$C_{13}H_{17}N_5O_5$ (323.3) Ber. C 48.29 H 5.30 N 21.66 Gef. C 48.11 H 5.34 N 21.51

Benzyloxycarbonyl-L-leucin-semicarbazid

a) *Dicyclohexylcarbodiimid-Methode:* 1.22 g *Semicarbazidhydrochlorid* in 5 ccm DMF werden mit 1.51 ccm Triäthylamin versetzt und 10 Min. kräftig gerührt. Nachdem man vom ausgeschiedenen Triäthylaminhydrochlorid abfiltriert hat, wird sirupöses *Benzyloxycarbonyl-leucin* (3.3 g, 10 mMol), gelöst in wenig DMF, hinzugegeben und unter Eiskühlung mit 2.06 g *DCCI* versetzt. Nach 24 Stdn. gibt man 3 Tropfen Eisessig hinzu, schüttelt um, filtriert nach einer weiteren Stde. und entfernt das Lösungsmittel i. Vak. (*N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoff 2.5 g). Der verbleibende Sirup kristallisiert beim Verreiben mit Äther langsam. Ausb. 2.6 g, Schmelzbereich 96–136°. Aus Essigester 1.04 g vom Schmelzbereich 108–125°, aus Nitromethan 0.85 g (26.5%) vom Schmp. 140–147°. Zur Analyse wurde 2 mal aus Nitromethan umkristallisiert, Schmp. 145–146°. $[\alpha]_D^{20}$: –11.5° ($c = 1$, in DMF).

$C_{15}H_{22}N_4O_4$ (322.4) Ber. C 55.89 H 6.88 N 17.38 Gef. C 55.95 H 7.09 N 17.29

b) *Nitrophenylester-Methode:* In einer wie unter a) hergestellten Lösung von *Semicarbazid* in DMF werden 3.86 g *Benzyloxycarbonyl-L-leucin-[p-nitro-phenylester]* gelöst. Nach 72 Stdn. wird i. Vak. eingeengt, in Essigester gelöst, 4 mal mit *n* NH₃, einmal mit *n* HCl geschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Rohausb. 1.2 g, aus Essigester 0.92 g (28.7%), Schmp. 138–144°.

c) *Anhydrid-Methode:* 2.9 g *Benzyloxycarbonyl-leucin* (10 mMol) werden in 1 ccm DMF gelöst, mit 1.2 g *N-Äthyl-piperidin* versetzt und auf –15° abgekühlt. Unter Rühren tropft

man 1.45 g *Chlorameisensäure-sek.-butylester* hinzu, wobei die Temperatur -10° nicht übersteigen soll. Die Mischung wird 10 Min. auf $+8^{\circ}$ erwärmt, schnell wieder auf -15° abgekühlt und tropfenweise mit einem Gemisch von 1.15 g *Semicarbazidhydrochlorid* und 1.2 g *N*-Äthylpiperidin in 15 ccm DMF versetzt. Die Temperatur soll -5° nicht übersteigen. Man rührt noch 30 Min. bei 0° , 2 Stdn. bei Raumtemperatur, destilliert das Lösungsmittel i. Vak. bei 60° Badtemperatur ab, löst den Rückstand in Essigester, schüttelt mit *n* HCl, KHCO_3 -Lösung und Wasser aus, trocknet über Natriumsulfat und engt i. Vak. ein. Nach dem Verreiben mit Äther verbleiben 1.5 g (46.5%), Schmp. $138-140^{\circ}$; aus Nitromethan 2.6 g (41%), Schmp. $143-145^{\circ}$.

d) *Durch Umsetzung von Benzyloxycarbonyl-leucinhydrazid mit Cyansäure*: 2.8 g *Z-Leucinhydrazid* werden in ca. 20 ccm *n* HCl gelöst und, wie beim *Z*-Propyl-leucin-semicarbazid beschrieben, mit *KOCN*-Lösung umgesetzt. Rohausb. 2.4 g (71%); aus Nitromethan 1.9 g (59%), Schmp. $144-146^{\circ}$.

L-Leucin-semicarbazid

a) *Durch HBr/Eisessig-Spaltung*

Acetat: 2.0 g *Benzyloxycarbonyl-leucin-semicarbazid* werden in 10 ccm 4 *n* HBr/Eisessig unter Zusatz von 100 mg Phenol gelöst und 20 Min. gerührt. Nach Ätherzugabe fallen ca. 2.2 g rohes Hydrobromid aus, das, aus absol. Methanol mit Äther umgefällt, 1.98 g einer zähen, schmierigen Masse ergibt. Nach Ausäthern wird die wäbr. Lösung des Hydrobromids über eine Amberlite IRA 400-Säule (*Acetat*-Form) vom Br^{\ominus} befreit. Nach Entfernen des Wassers im Rotationsverdampfer, Lösen des Rückstandes in Äthanol und Ausfällen mit Äther werden nach kräftigem Verreiben 1.21 g *Leu-Sem-acetat* erhalten (78%). Schmp. $108-110^{\circ}$ (Zers.). Analyse des rohen Acetats:

$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$ (248.3) Ber. C 43.54 H 8.12 N 22.56 Gef. C 42.33 H 8.17 N 22.67

Reinigung durch Lösen in Äthanol und Ausfällen mit Äther lieferte ein Produkt, das bei 108° leicht sinterte, aber erst bei $135-138^{\circ}$ schmolz.

Gef. C 43.68 H 8.18 N 22.24

Hydrochlorid: Eine Lösung des *Acetats* in absol. Äthanol wird bei 0° mit HCl in Isopropylalkohol angesäuert und das *Hydrochlorid* sofort mit Äther ausgefällt. Schmp. $154-157^{\circ}$ (Zers.).

$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}$ (224.7) Ber. C 37.41 H 7.63 Gef. C 37.13 H 7.53

Die Verbindungen waren, abgesehen von einer geringfügigen Leucinspur, chromatographisch einheitlich. R_F (A) 0.95, R_F (B) 0.55. Die Anwesenheit von Semicarbazid und Leucinhydrazid konnte durch Ausbleiben der Fluoreszenz nach Behandlung mit Salicylaldehyd und *p*-Dimethylamino-benzaldehyd mit Sicherheit ausgeschlossen werden¹⁶⁾.

b) *Spaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak*: Man gibt 1.0 g *Z-Leu-Sem* und 500 mg trockenes Acetamid in einen Dreihalskolben und destilliert mit Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung vorbehandeltes Ammoniak (ca. 100 ccm) hinein. Der eine Hals ist mit einer Y-Verzweigung versehen, in die ein kleiner Trichter (+ Glaswolle) in Höhe der Abzweigung eingehängt ist. Das darüber befindliche, mit einem Schlauchansatz versehene Zwischenstück zentriert das abtropfende NH_3 auf den Trichter und ist anfangs mit dem Na/ NH_3 -Destillierkolben, später mit dem zweiten seitlichen Hals mit einem PVC-Schlauch verbunden. Darüber befindet sich ein mit Trockeneis beschickter Kühlfinger. Portionsweise auf den Trichter gebrachtes Natrium wird durch den NH_3 -Rückfluß gelöst und fließt in das Reaktionsgemisch (200–250 mg Na sind erforderlich). Beim Eintritt einer 15 Sek. bleibenden Blaufärbung wird

¹⁶⁾ F. FEIGL, Spot Tests in Organic Analysis, S. 300, Elsevier, Amsterdam 1956.

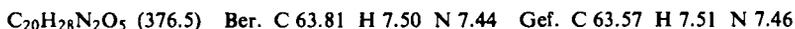
der Kolben mit Trockeneis/Aceton abgekühlt, das Aufsatzteil mit dem restlichen Na entfernt und Ammoniumchlorid bis zum Verschwinden der Trübung hinzugefügt. Das Ammoniak wird an der Wasserstrahlpumpe vollständig entfernt. Dünnschichtchromatographisch enthält das Reaktionsgemisch kein Leucin, Leucinhydrazid und Semicarbazid.

Nach Auflösen in Eiswasser und Zugabe von Essigsäure bis pH 4 wird das Produkt an eine Dowex 50 X 12-Säule (H⁺-Form) adsorbiert und die Säule mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Mit *n* NH₃ wird das *Leucinsemicarbazid* eluiert, und anschließend wird die Säule neutralgewaschen. Die vereinigten Eluate dampft man i. Vak. sofort zur Trockne. Der sirupöse Rückstand kristallisiert nach Verreiben mit Äther/Hexan über Nacht teilweise. Die freie Base, Schmp. 148–150°, wurde ungereinigt analysiert.

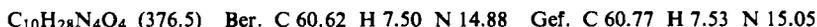


Während die kristalline Base frei von Leucin war, enthielt das aus der sirupösen Base erhaltene Hydrochlorid erhebliche Leucinverunreinigungen. Durch die Behandlung mit dem stark sauren Austauscher wird das Produkt partiell gespalten. Die Ausbeute an verunreinigtem Hydrochlorid betrug 410 mg (59%).

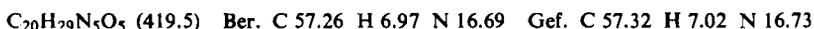
Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucin-methylester: 7.4 g (20 mMol) *Z-L-Prolin-[p-nitrophenylester]* und 14.4 g *L-Leucin-methylester-hydrochlorid* werden unter Zugabe von 3.6 ccm Triäthylamin in ca. 30 ccm Chloroform gelöst. Die Mischung wird 72 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen, i. Vak. eingedampft und der Rückstand in Essigester gelöst. Nach dem Abfiltrieren von einem Nebenprodukt (ca. 1 g Blättchen, Schmp. 234–238°) erfolgt 5 maliges Ausschütteln mit *n* NH₃, 1 mal mit *n* HCl und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄, Entfernen des Lösungsmittels i. Vak., Lösen des Rückstandes in Äther und Zugabe von Petroläther. Reinigung durch Umfällen mit Hexan aus Äther. Ausb. 6.38 g (84.5%), Schmp. 74–75°. $[\alpha]_D^{20}$: $-42.5 \pm 1^\circ$ (*c* = 1, in DMF).



Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucin-hydrazid: 3.76 g *Z-Prolyl-leucin-methylester* werden in 5 ccm absol. Äthanol und 2.5 ccm 90-proz. *Hydrazinhydrat* gelöst. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur beginnt die Kristallausscheidung. Nach 96 Stdn. wird abgesaugt und 2 mal mit Äthanol gewaschen. Ausb. 3.4 g (90%), Schmp. 149–150°. Umkristallisation erfolgt aus Wasser.



Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucin-semicarbazid: 3.76 g *Z-Prolyl-leucin-hydrazid* werden in ca. 20 ccm *n* HCl gelöst. Nach Filtration gibt man so lange gekühlte, ca. 20-proz., frisch bereitete *Kaliumcyanat*-Lösung hinzu, bis pH 5–6 erreicht ist. Der ausgeschiedene Sirup wird kräftig mit einem Glasstab gerieben, wobei man weitere Cyanat-Lösung bis pH 8 hinzugibt. Das Gemisch schäumt hierbei stark. Durch Zugabe von *n* HCl wird unter kräftigem Reiben langsam auf pH 6 eingestellt und die Lösung über Nacht so belassen. Nach dem Ansäuern wird der inzwischen kristallisierte Niederschlag abgesaugt, im Mörser zur Entfernung des nicht umgesetzten Hydrazids mit *n* HCl verrieben, mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser neutralgewaschen und getrocknet. Rohausb. 2.72 g (65%), Schmp. 185–195°. (Aus den sauren Filtraten scheidet sich nach längerem Stehenlassen noch weiteres, weniger reines Produkt aus.) Aus Nitromethan 2.46 g (58.5%), Schmp. 207–210°. Die Analysenprobe schmolz bei 212–213°. $[\alpha]_D^{20}$: $+53.5 \pm 1^\circ$ (*c* = 1, in DMF).



Versuche, die Reaktion statt in heterogener Phase in DMF/Eisessig durchzuführen, lieferten ein wesentlich unreineres Produkt; nach Umkristallisation Ausb. 24%, Schmp.

190–194°. Versuche, Leucin-semicarbazid-hydrobromid, wie beim Z-Pro-Leu-OCH₃ beschrieben, mit Z-Prolin-[*p*-nitro-phenylester] zu acylieren, zeigten nur geringfügige Umsetzung.

L-Prolyl-L-leucin-semicarbazid-hydrobromid: Unter Feuchtigkeitsausschluß werden 420 mg *Z-Prolyl-leucin-semicarbazid* in 3 ccm ca. 4 *n* HBr/Eisessig unter Zusatz eines Kristalles Phenol gelöst. Nach 15–20 Min. Rühren ist die Abspaltung beendet. Das Hydrobromid wird mit ca. 20 ccm absol. Äther gefällt und 2mal mit Äther gewaschen (475 mg Rohprodukt). Br-Gehalt 32.3%. Nach dem Umfällen aus Methanol mit Äther enthielt die hygroskopische Verbindung 28.6% Br, was 1.5 Mol. HBr pro Mol. entspricht (Ber. 29.5%). Im Dünnschichtchromatogramm war das Produkt einheitlich. R_F (A) 0.15, R_F (B) 0.24. Es empfiehlt sich, das Hydrobromid sofort weiterzuverwenden.

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-L-leucin-semicarbazid: Die aus 224 mg *Z-Glycinhydrazid* in 2 ccm DMF und 0.5 ccm konz. Salzsäure mit 0.3 ccm 25-proz. Natriumnitrit-Lösung bereitete Azidlösung wird, wie bei Z-Gly-Gly-NH-NH-CO-NH₂ beschrieben, mit der neutralisierten Lösung von 365 mg *Prolyl-leucin-semicarbazid-hydrobromid* in 1 ccm DMF und 1 ccm Wasser umgesetzt. Im Verlauf der Reaktion ist weitere Wasserzugabe erforderlich. Nach 24 Stdn. bei 0° wird der ausgeschiedene Niederschlag, 60 mg, Schmp. 225–229°, abfiltriert und die Lösung in Wasser gegossen. Nach Eindampfen i. Vak. und Aufnehmen des Rückstandes in Äthanol verbleiben 210 mg, Schmp. 180–220°. Gesamtrohausb. 270 mg (63%). Aus Äthanol 150 mg (35%) analysenreine Substanz, Schmp. 230–232°.

C₂₂H₃₂N₆O₆ (476.5) Ber. C 55.45 H 6.77 N 17.88 Gef. C 55.51 H 6.88 N 17.88
