

Friedrich Weygand, Axel Prox und Wolfgang König

Racemisierung bei Peptidsynthesen *)

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 8. November 1965)

16 verschiedene Methoden der Peptidsynthese wurden bei der Verknüpfung von Z-L-Leu-L-Phe-OH mit H-L-Val-OtBu auf die dabei mögliche Racemisierung untersucht. Als analytisches Verfahren diente die gaschromatographische Diastereoisomerentrennung von N-TFA-Dipeptid-methylestern. Die verschiedenen Methoden der Peptidsynthese wurden in einer Reihe zunehmender Racemisierung gruppiert.

Die vollständig racemisierungsfreie Peptidsynthese wird bei der in Gang kommenden Synthese von langkettigen Peptiden, wie sie in Proteinen und Enzymen vorkommen, von großer Bedeutung sein. Insbesondere dann, wenn etwa entstehendes racemisches Material nicht mehr durch Kristallisation abgetrennt werden kann, wie das bei kurz-kettigen Peptiden oder ihren Derivaten häufig noch möglich ist.

Von den zur Prüfung auf Racemisierung bei Peptidsynthesen geeigneten Methoden ist die von uns angegebene gaschromatographische¹⁾, die sich der Trennung diastereoisomerer N-Trifluoracetyl-dipeptid-methylester bedient, die sicherste und schnellste und bei vielen Aminosäurekombinationen anwendbar. Über einen Teil der Ergebnisse ist bereits berichtet worden¹⁻⁶⁾.

Da bei der Verknüpfung von Peptiden miteinander keine Racemisierung in demjenigen Peptid eintritt, das als Aminokomponente eingesetzt wird⁷⁾, genügt es vollkommen, die Verknüpfung von N-geschützten Dipeptiden, z. B. Z-As³-As²-OH, mit einem Aminosäureester H-As¹-OR zu untersuchen. Aus dem Anteil an Diastereoisom-

*) Abkürzungen: Z = Benzyloxycarbonyl; pMZ = p-Methoxy-benzyloxycarbonyl; THF = Tetrahydrofuran; HOip = N-Hydroxy-piperidin; HOChin = 8-Hydroxy-chinolin; HONP = p-Nitro-phenol; CDI = Carbonyldiimidazol; CDT = Carbonylditriazol; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid; TFA = Trifluoracetyl; As = Aminosäure.

- 1) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, *Angew. Chem.* **75**, 282 (1963).
- 2) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, *Peptides (Proc. V. Europ. Peptide Symposium, Oxford, Sept. 1962)*, S. 97-107, Pergamon Press, Oxford 1963.
- 3) A. Prox, F. Weygand, W. König und L. Schmidhammer, *Proc. VI. Europ. Peptide Symposium, Athen, Sept. 1963*, Pergamon Press, Oxford, im Druck.
- 4) H. C. Beyerman, W. Maassen van den Brink, F. Weygand, A. Prox, W. König, L. Schmidhammer und E. Nintz, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **84**, 213 (1965).
- 5) F. Weygand und W. König, *Z. Naturforsch.* **20b**, 710 (1965).
- 6) F. Weygand, W. König, R. Buyle und H. G. Viehe, *Chem. Ber.* **98**, 3632 (1965).

7) So wurde bei der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-L-Val-OtBu aus Z-L-Leu-L-Phe-OH und H-L-Val-L-Val-OtBu nach Anwendung der Methode der gemischten Anhydride oder der Phosphoazomethode nach der Partialhydrolyse reines L-Val-L-Val nachgewiesen.

merem in dem durch Partialhydrolyse erhaltenen Dipeptid As²-As¹, das racemisierungsfrei aus dem Tripeptid hervorgeht⁸⁾, ergibt sich die Racemisierung in der Aminosäure As².

In der Tab. sind alle bisherigen Untersuchungen über die Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-OtBu aus Z-L-Leu-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu zusammengefaßt, wobei die Methoden von oben nach unten etwa in der Reihenfolge zunehmender Racemisierung aufgeführt sind. Bei allen Versuchen, mit Ausnahme der Versuche Nr. 10 und 16, wurde dest. L-Valin-tert.-butylester eingesetzt, da sich gezeigt hatte, daß durch Triäthylamin oder Triäthylamin-hydrochlorid die Racemisierung verstärkt wird^{1-3,9}. Im übrigen wurden die Peptidsynthesen unter den von den verschiedenen Autoren angegebenen Bedingungen ausgeführt.

Racemisierungsuntersuchungen bei der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-OtBu aus Z-L-Leu-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu. Die Partialhydrolyse erfolgte bei 70°, 24 Stdn. mit 8.5 n methanolischer HCl. Bei den Methoden 10 und 16 wurde Esterhydrochlorid eingesetzt

Nr.	Methode	Lösungs- mittel	Temp.	Zeit (Stdn.)	% D-Phe-L-Val	Lit.
1	Azid	Essigester	0°	48	0, Nullwert 1.3 %	3)
2	HOPip	THF	40°	44	0	5)
3	HOChin	THF	40°	44	0	
4	Vinylester ^{a)}	Malonester	30°	86	0, Nullwert 0.6 %	4)
5	SC ₆ H ₅	THF	40°	22	0	
6	ONP	CH ₃ CN	30°	21	0, Nullwert 2.2 %	4)
7	Äthoxyacetylen	Essigester	20°	24	2.4	3)
		Essigester	77°	1	7.7	3)
8	CDI	THF	0°	20	2.8	3)
		THF	20°	20	4.8	3)
9	Woodwards Reagens K	CH ₃ CN	0°	22	3.2	3)
10	Patchornik	THF	0°	0.16	4.45	3)
11	Gem. Anhydr. (OCO ₂ C ₂ H ₅)	THF	35° ^{b)}	16	4.9	3)
12	CDT	THF	20°	18	6.8	
13	DCCI	THF	-10°	48	6.0	3)
		THF	20°	24	12.5	3)
14	1-Äthyl-3-[3-dimethyl- amino-propyl]-carbo- diumid·HCl	CH ₃ CN	0°	18	18.8	
		H ₂ O/Dioxan	0°	18	18.2	
15	[tert.-Butyl-äthynyl]- dimethylamin	THF	0°	23.5	26.5	6)
		THF	35°	1.7	20.6	6)
		THF	50°	4	21.3	6)
16	Phosphoazo	Pyridin	100°	3	28.3	3)

^{a)} An Stelle des Z-Restes wurde in diesem Falle der pMZ-Rest verwendet.

^{b)} Anhydridbildung 10 Min. bei -10°, Zusammengeben der Komponenten bei -35°, dann langsames Erwärmen auf 20°.

8) F. Weygand, W. König, A. Prox und K. Burger, Chem. Ber. 99, 1443 (1966).

9) M. W. Williams und G. T. Young, Peptides (Proc. V. Europ. Peptide Symposium, Oxford, Sept. 1962), S. 119, Pergamon Press, Oxford 1963; J. chem. Soc. [London] 1963, 881.

Diskussion der Ergebnisse

1. Die *Azid-Methode* von Curtius¹⁰ haben wir an die Spitze der Tabelle gesetzt, weil bei unseren Versuchen keinerlei Racemisierung nachgewiesen wurde, in Übereinstimmung mit den auf andere Weise gewonnenen Resultaten. So beobachtete man in Testversuchen nach Young bei der Umsetzung von Acetyl-L-Leu-N₃¹¹ bzw. Benzoyl-L-Leu-N₃⁹ oder Formyl-L-Leu-N₃¹² mit Glycin-äthylester keine Racemisierung. Ebenso war die Verknüpfung von *N*-TFA-L-Val-N₃ mit H-L-Val-OCH₃ oder mit HCl-L-Val-OCH₃ + Triäthylamin racemisierungsfrei¹¹. Dagegen findet man bei der zuletzt genannten Synthese in Gegenwart eines Überschusses von 1 Äquiv. Triäthylamin 27% an *N*-TFA-D-Val-L-Val-OCH₃. Auch die Herstellung von Estern aus Aziden in Gegenwart von Triäthylamin ist nicht racemisierungsfrei. So wurde bei der Umsetzung von Z-L-Leu-L-Phe-N₃ mit Methanol in Gegenwart von Triäthylamin (3 Tage Eisschrank) nach der (racemisierungsfreien) Überführung in die *N*-TFA-Verbindung ein Gehalt von 18,8% an *N*-TFA-L-Leu-D-Phe-OCH₃ gefunden.

Es empfiehlt sich also auch bei der Azidmethode, jeden Basenüberschuß zu vermeiden und nur die freien Peptidester einzusetzen.

2. Die von G. T. Young in die Peptidchemie eingeführten *N*-Hydroxy-piperidinderester (HOPIP-Methode)¹³ zeigen im Young-Test wie auch in unserem Test keinerlei Racemisierung, und zwar sowohl bei der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-OPip als auch bei der Kondensation mit H-L-Val-OtBu⁵. Die HOPIP-Methode ist hervorragend geeignet zur Darstellung von Z- oder pMZ-Tripeptidestern¹⁴.

3. Bei den 8-Hydroxy-chinolinestern (OChin-ester), erstmals von H.-D. Jakubke¹⁵ bei der Peptidsynthese eingesetzt, hat schon der Autor mit Hilfe des Anderson-Tests (Z-Gly-L-Phe-OChin + H-Gly-OC₂H₅) keine Racemisierung gefunden. Wir konnten nach der Herstellung von Z-L-Leu-L-Phe-OChin nach der Methode der gemischten Anhydride und der Kondensation des Dipeptidesters mit H-L-Val-OtBu nur eine Spur von D-Phe feststellen. Mit 4mal umkristallisiertem Z-L-Leu-L-Phe-OChin war auch diese Spur verschwunden.

4. Die Vinylestermethode¹⁶ verlief bei der Umsetzung von TFA-L-Val-OCH=CH₂ mit H-L-Val-OCH₃ racemisierungsfrei^{1,2}. Die Herstellung von pMZ-L-Leu-L-Phe-OCH=CH₂ aus pMZ-L-Leu-OH und H-L-Phe-OCH=CH₂ nach der Methode der gemischten Anhydride gelang nicht racemisierungsfrei. Nach Abzug des vorhandenen Blindwertes verläuft die Tripeptidsynthese racemisierungsfrei⁴.

¹⁰ Th. Curtius, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

¹¹ N. A. Smart, G. T. Young und M. W. Williams, J. chem. Soc. [London] **1960**, 3902.

¹² A. L. Heard und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1963**, 5807.

¹³ S. M. Beaumont, B. O. Hanford und G. T. Young, VII. Europ. Peptidsymposium, Budapest, Sept. 1964; Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 37 (1965); S. M. Beaumont, B. O. Hanford, J. H. Jones und G. T. Young, Chem. Comm. **1965**, 53; B. O. Hanford, J. H. Jones, G. T. Young und T. F. N. Johnson, J. chem. Soc. [London], im Druck.

¹⁴ F. Weygand, W. König, D. Hoffmann, P. Huber, N. M. Khan, E. Nintz und W. Prinz, Chem. Ber., in Vorbereitung.

¹⁵ H.-D. Jakubke, Z. Naturforsch. **20b**, 273 (1965).

¹⁶ F. Weygand und W. Steglich, Angew. Chem. **73**, 757 (1961).

5. Werden stärker aktivierte Ester zur Peptidsynthese eingesetzt, steigt die Gefahr der Racemisierung erheblich an. Hierbei spielen die Reaktionsbedingungen eine ausschlaggebende Rolle. So soll bei der Verknüpfung von Z-Gly-L-Leu-SC₆H₅ mit Glycin nach der Thiophenylestermethode¹⁷⁾ in wäßrig-alkalischem THF bei 60° keine Racemisierung auftreten¹⁸⁾. Im Anderson-Test wurde nach der Herstellung von Z-Gly-L-Leu-SC₆H₅ nach der Methode der gemischten Anhydride ebenfalls keine Racemisierung gefunden^{19,4)}. Bei der Umsetzung von Z-Gly-L-Phe-SC₆H₅ mit Glycin unter Imidazolzusatz in Wasser wurden etwa 5% Racemat beobachtet²⁰⁾. Die Kondensation von Z-L-Val-SC₆H₅ mit L-Valin in siedendem Essigessig lieferte 14.5% D-L-Verbindung^{1,2)}. Schließlich stellten *Liberek* und *Michalik*²¹⁾ bei der Umsetzung von Z-L-β-Cyanalanin-thiophenylester mit Glycin-methylester eine starke Abhängigkeit der Racemisierung vom Lösungsmittel fest. Sie war am größten in Dimethylformamid und am geringsten in THF.

In unseren Versuchen ermittelten wir nach der Herstellung von Z-L-Leu-L-Phe-SC₆H₅ aus Z-L-Leu-OH und HBr·L-Phe-SC₆H₅ nach der Methode der gemischten Anhydride und der Kondensation des Rohproduktes mit H-L-Val-OtBu in THF 2.7% D-Phe im Tripeptid. Nach der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-SC₆H₅ aus Z-L-Leu-L-Phe-OH und Thiophenol mit DCCI betrug nach der Umsetzung des Rohproduktes mit H-L-Val-OtBu der Gehalt an D-Phe nur 1.8%²²⁾. Wurde jedoch der Z-Dipeptid-thiophenylester einmal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert, so war im Tripeptid kein D-Phe mehr zu finden.

6. Auch bei den *p*-Nitro-phenylestern²³⁾ stellte man fest, daß die Peptidsynthese ohne Basenzusatz racemisierungsfrei verlaufen kann^{24,9,12,25)}. Bei der Peptidsynthese mit Esterhydrochloriden unter Zusatz von tert. Amin konnte partielle Racemisierung beobachtet werden⁹⁾.

Nach Abzug des Blindwertes war auch in unserem Falle die Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-OtBu in Acetonitril racemisierungsfrei⁴⁾.

Die nachstehend zu behandelnden Methoden 7—16 unterscheiden sich von den voranstehenden dadurch, daß die aktivierten Zwischenprodukte nicht isoliert werden.

7. Mit Äthoxyacetylen als aktivierendem Agens²⁶⁾ wurde beim Anderson-Test mit dest. Glycin-äthylester in siedendem Essigester keine Racemisierung gefunden^{27,28)}.

17) *Th. Wieland, W. Schäfer* und *E. Bokelmann*, *Liebigs Ann. Chem.* **573**, 99 (1951).

18) *Th. Wieland* und *B. Heinke*, *Liebigs Ann. Chem.* **615**, 184 (1958).

19) *H. Determann* und *Th. Wieland*, *Liebigs Ann. Chem.* **670**, 136 (1963).

20) *Th. Wieland, H. Determann* und *W. Kahle*, *Angew. Chem.* **75**, 209 (1963).

21) *B. Liberek* und *A. Michalik*, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* **44**, 71 (1965).

22) Nach *Determann* und *Wieland*¹⁹⁾ verläuft die Herstellung von Z-Gly-L-Phe-SC₆H₅ aus Z-Gly-L-Phe-OH und Thiophenol nach der Methode der gemischten Anhydride unter starker Racemisierung.

23) *M. Bodánszky*, *Nature [London]* **175**, 685 (1955); *M. Bodánszky, M. Szelke, E. Tömörkény* und *E. Weisz*, *Chem. and Ind.* **1955**, 1517.

24) *M. Goodman* und *K. C. Stueben*, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 3980 (1959).

25) *B. Rzeszotarska, E. Taschner* und *A. Kuziel*, *Proc. VI. Europ. Peptide Symposium*, Athen, Sept. 1963, Pergamon Press, Oxford, im Druck.

26) *J. F. Arens*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **74**, 769 (1955).

27) *H. J. Panneman, A. F. Marx* und *J. F. Arens*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **78**, 487 (1959).

28) *J. C. Sheehan* und *J. J. Hlavka*, *J. org. Chemistry* **23**, 635 (1958).

Wurde Glycin-äthylester-hydrochlorid eingesetzt, so trat 45% Racemat auf²⁷⁾. Wir fanden in unserem Test mit dest. H-L-Val-OtBu bei 20° 2.4% und in siedendem Essigester 7.7% D-Phe im Tripeptid³⁾.

8. Mit Carbonyldiimidazol (CDI)²⁹⁾ fand schon *Anderson* in seinem Test bei -10° und Aufwärmenlassen auf 20° in DMF 0.5% Racemat sowie 87% L-Verbindung und bei 20° in THF 5% Racemat²⁹⁾. Bei 20°-Versuchen in DMF unter Verwendung von Esterhydrochlorid und Triäthylamin wurde über die Bildung von 17% Racemat im Anderson-Test berichtet³⁰⁾. Wurde derselbe Test bei 30° in THF ausgeführt, so wurden 32% Racemat neben 52% L-Verbindung isoliert, und bei Zusatz von *N*-Hydroxy-succinimid stieg der Anteil an Racemat auf 57%, und nur noch 23% L-Verbindung waren isolierbar³¹⁾. Bei der Umsetzung von *N*-TFA-L-Val-OH mit H-L-Val-OCH₃ bei -10° hatten wir 9.2% und bei 24° 45% D-L-Verbindung gefunden^{1,2)}.

Im vorliegenden Test (Tab., Vers. 8) wurden nach der Synthese bei 0° 2.8% und bei 20° 4.8% D-Phe gefunden³⁾.

9. Mit *Woodwards* Reagens K (*N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3-sulfonat)³²⁾ wurde von den Autoren im Anderson-Test über nur sehr geringe Racemisierung berichtet, während *Williams* und *Young*⁹⁾ bei der Umsetzung von Benzoyl-L-valin mit Glycin-äthylester in Acetonitril keine Racemisierung fanden, wohl aber eine partielle in Nitromethan, oder wenn Esterhydrochlorid und Triäthylamin eingesetzt wurden.

Bei der Synthese von TFA-Val-Val-OCH₃ aus TFA-L-Val-OH und H-L-Val-OCH₃ in Acetonitril fanden wir mit dest. Ester 35% D-L-Verbindung. Im vorliegenden Test wurden 3.2% D-Phe festgestellt.

10. Bei der oxydativen Kupplung (mit Bromsuccinimid, Jod) von Hydraziden mit Aminosäureestern³³⁾ fanden die Autoren im Anderson-Test 1.1% Racemat neben 63% L-Verbindung, bei der Umsetzung von TFA-L-Val-NHNH₂ und HCl-L-Val-OCH₃ + Triäthylamin wurden 11.7% D-L-Verbindung erhalten^{1,2)}. Nach Vers. 10 der Tab. wurden 4.5% D-Phe im Tripeptid gefunden.

11. Bei der Methode der gemischten Anhydride³⁴⁾ hängt die mögliche Racemisierung sehr stark von den Bedingungen der Bildung der gemischten Anhydride ab^{19,31)}. Im allgemeinen ist es unmöglich, nach dieser Methode Peptide racemisierungsfrei

²⁹⁾ *G. W. Anderson* und *R. Paul*, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4423 (1958); *R. Paul* und *G. W. Anderson*, ebenda **82**, 4596 (1960).

³⁰⁾ *H. C. Beyerman* und *W. Maassen van den Brink*, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **80**, 1372 (1961).

³¹⁾ *G. W. Anderson*, *F. M. Callahan* und *J. E. Zimmerman*, Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 51 (1965).

³²⁾ *R. B. Woodward*, *R. A. Olofson* und *H. Mayer*, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).

³³⁾ *Y. Wolman*, *P. M. Gallop* und *A. Patchornik*, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1263 (1961); *Y. Wolman*, *P. M. Gallop*, *A. Patchornik* und *A. Berger*, ebenda **84**, 1889 (1962).

³⁴⁾ *Th. Wieland* und *H. Bernhard*, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951); *R. A. Boissonnas*, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951); *J. R. Vaughan jr.*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 1389 (1951); *J. R. Vaughan jr.* und *R. L. Osato*, ebenda **73**, 5553 (1951).

mit Aminosäureestern zu verknüpfen^{9,11,12,25,35,36}). Es nimmt daher nicht wunder, daß wir 4.9% D-Phe in unserem Test beobachteten.

12. Ähnlich wie Carbonyldiimidazol zeigt auch Carbonylditriazol³⁰) Racemisierung³¹), wie auch aus unserem Test hervorgeht.

13. Das häufig zur Peptidbildung angewandte Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)³⁷) liefert bei der Verknüpfung von Peptiden mit Aminosäureestern oder Peptidestern nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren stets Racemisierung, die stark temperaturabhängig ist und die sich bei Zugabe von tert. Aminen noch erhöht^{1,2,9,11,25,36,38}). Die Temperaturabhängigkeit der Racemisierung wird auch in unserem Test beobachtet³).

14. Bei Verwendung des wasserlöslichen Diimids³⁹), das eine tert. Aminogruppe besitzt, sind erwartungsgemäß durch die erleichterte Azlactonbildung die Racemisierungen noch höher.

15. Die Verwendung von Inaminen nach Buyle und Viehe⁴⁰) ist zur Verknüpfung von Peptiden mit Aminosäureestern oder Peptidestern nicht geeignet, da neben der starken Racemisierung auch Addition des Inamins an intermediär gebildetes Azlacton eintritt⁶).

16. Die Phosphoazo-Methode⁴¹) liefert nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren^{9,11,25,42}) erhebliche Racemisierung, die wir ebenfalls beobachteten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Untersuchungen und Fräulein I. Kessler für die sorgfältige Ausführung der gaschromatographischen Untersuchungen.

Beschreibung der Versuche

Aufarbeitung nach der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-OtBu und Bestimmung der Racemisierung im Phenylalanin: Nach beendeter Peptidsynthese wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 0.5 N HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft.

Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde der Z-Tripeptid-OtBu (ca. 0.1 mMol) in 1 ccm Trifluoressigsäure unter Zusatz von 0.2 ccm Anisol gelöst und 45 Min. auf 80° erhitzt⁴³). Sodann wurde i. Vak. eingedampft, absol. Äther nachdestilliert, der Rückstand in Wasser

³⁵) Vgl. auch J. R. Vaughan jr., J. Amer. chem. Soc. **74**, 6137 (1952).

³⁶) H. Schwarz und F. M. Bumpus, J. Amer. chem. Soc. **81**, 890 (1959).

³⁷) J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

³⁸) G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2902 (1958); K. Hofmann, M. E. Woolner, G. Spühler und E. T. Schwartz, ebenda **80**, 1486 (1958); B. Riniker und R. Schwyzer, Helv. chim. Acta **44**, 658 (1961).

³⁹) J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank und G. L. Boshart, J. org. Chemistry **26**, 2525 (1961).

⁴⁰) R. Buyle und H. G. Viehe, Angew. Chem. **76**, 572 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 582 (1964).

⁴¹) St. Goldschmidt und H. Lautenschlager, Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 (1953); St. Goldschmidt und H. L. Krauss, Angew. Chem. **67**, 471 (1955); St. Goldschmidt und Ch. Jutz, Chem. Ber. **89**, 518 (1956).

⁴²) W. Grassmann, E. Wünsch und A. Riedel, Chem. Ber. **91**, 455 (1958); St. Goldschmidt und K. K. Gupta, Chem. Ber. **98**, 2831 (1965).

⁴³) F. Weygand und W. Steglich, Z. Naturforsch. **14b**, 472 (1959).

gelöst und mit Amberlite IR 4b bis zur neutralen Reaktion gerührt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und gut mit Wasser gewaschen. Nun wurde i. Vak. eingedampft und einmal absol. Äthanol nachdestilliert.

Zur Partialhydrolyse erhitzte man das freie Tripeptid in 4 ccm 8.5 *n* methanolischer HCl in einem Bombenrohr 24 Stdn. auf 70°. Danach wurde i. Vak. eingedampft.

Zur *N*-Trifluoressigsäure-methylester löste man den Rückstand in 0.5 ccm Methanol, versetzte mit 1 ccm *Trifluoressigsäure-methylester* und drei Tropfen Triäthylamin (Reaktion schwach basisch), ließ über Nacht stehen und dampfte zur Trockne ein. Nach dem Lösen in Essigester wurde mit 0.5 *n* HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurde in wenig Essigester aufgenommen und die gaschromatographische Analyse ausgeführt. Angewendet wurde eine 50 m lange Stahlkapillare, belegt mit Polyphenyläther (Golay-Säule OS 138; Perkin-Elmer Fraktometer 116 E; Trägergas Stickstoff, 62 ccm/Min., Temp. 210–220°, Teilungsverhältnis 1:20–1:30, Flammenionisationsdetektor). Das Verhältnis *N*-TFA-*L*-Phe-*L*-Val-OCH₃:*N*-TFA-*D*-Phe-*L*-Val-OCH₃ ergab sich aus den Flächenverhältnissen nach Planimetrierung.

Alle bei den verschiedenen Peptidsynthesen eingesetzten Ausgangsmaterialien wurden in gesonderten Untersuchungen auf sterische Reinheit geprüft.

N-Benzyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin-methylester: 5 mMol *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-leucin und 5 mMol Triäthylamin in 10 ccm absol. Tetrahydrofuran wurden auf –35° abgekühlt. Unter Rühren ließ man bei dieser Temperatur 5 mMol *Chlorameisensäure-äthylester*, gelöst in etwa 5 mMol Tetrahydrofuran, zutropfen. Dabei fiel Triäthylammoniumchlorid aus. Nach beendeter Zugabe brachte man in ein Eis/Kochsalzbad von –10° und ließ 10 Min. stehen. Danach wurde erneut auf –35° gekühlt und die ebenfalls auf diese Temp. gebrachte Lösung von 5 mMol *L*-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 5 mMol Triäthylamin auf einmal zugegeben. Nach einigen Minuten stellte man den Ansatz wieder in ein Eis/Kochsalzbad von –10° und ließ danach auf Raumtemperatur kommen. Nach Absaugen des Triäthylammoniumchlorids wurde i. Vak. eingedampft, in Essigester aufgenommen und nacheinander mit 0.5 *n* HCl, Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Ausb. 74%, Schmp. 81° (Essigester/Petroläther), $[\alpha]_{546}^{20}$: –26.8° (*c* = 1.3, in absol. Methanol).

C₂₄H₃₀N₂O₅ (426.5) Ber. C 67.58 H 7.09 N 6.57 Gef. C 67.60 H 7.21 N 6.67

N-Benzyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin: 1.05 g des vorstehenden *Methylesters* wurden in 10 ccm Aceton mit 1 ccm 1 *n* NaOH versetzt. Nach 2 Stdn. bei Raumtemp. wurde mit 0.5 *n* HCl neutralisiert und das Aceton i. Vak. abdestilliert. Dabei schied sich ein Öl ab. Nun wurde mit 0.5 *n* HCl angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen i. Vak. erfolgte Kristallisation beim Anreiben mit Petroläther. Dünnschichtchromatographisch konnte kein Ester mehr nachgewiesen werden. Ausb. 0.92 g (90%), nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther oder aus Toluol (1 g aus 30 ccm) Schmp. 102–104°, $[\alpha]_{546}^{20}$: –12.7° (*c* = 1, in absol. Methanol).

C₂₃H₂₈N₂O₅ (412.5) Ber. C 66.96 H 6.84 N 6.79 Gef. C 67.36 H 6.81 N 6.54

Zur Prüfung auf sterische Einheitlichkeit wurden 50 mg durch Erhitzen mit Trifluoressigsäure entcarbobenzoyliert, mit 0.5 *n* methanolischer HCl (bei 20° 24 Stdn.) verestert und mit Trifluoressigsäure-methylester/Triäthylamin *N*-trifluoressigsäure-methylesterisiert. Gaschromatographisch war die Substanz einheitlich.

Racemisierungsuntersuchungen bei der Synthese von Z-L-Leu-L-Phe-L-Val-OtBu aus Z-L-Leu-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu (Reihenfolge wie in Tab. 1)

1. *Azid-Methode*: Z-L-Leu-L-Phe-NHNH₂ wurde in üblicher Weise aus dem *Methylester* mit *Hydrazin* hergestellt. Der eingesetzte *Methylester* zeigte im Reinheitstest (Abhydrieren des Z-Restes mit Pd/BaSO₄-Katalysator in Methanol in Gegenwart von 2–3 Äquivv. HCl und Trifluoracetylierung) 1.3% L-D-Verbindung.

Zur Suspension von 106 mg (0.25 mMol) Z-L-Leu-L-Phe-NHNH₂ in 5 ccm 1 n HCl gab man tropfenweise Eisessig, bis sich alles gelöst hatte. Nach dem Abkühlen auf 0° versetzte man mit 0.25 mMol *Natriumnitrit* in wenig Wasser. Alsbald wurde mit etwas Wasser verdünnt und zweimal sofort mit gekühltem Essigester das *Azid* ausgeschüttelt. Nach dem zweimaligen Waschen mit gekühlter *Natriumhydrogencarbonatlösung* und mit Wasser wurde mit *Natriumsulfat* getrocknet. Der kalten Lösung fügte man 42 mg (0.25 mMol) H-L-Val-OtBu zu und ließ 48 Stdn. im Eisschrank stehen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

2. *N-Hydroxy-piperidinester*: Diese Versuche wurden bereits beschrieben⁵⁾.

3. *8-Hydroxy-chinolinester*: 1.33 g Z-L-Leu-OH und 500 mg *Triäthylamin* wurden in 30 ccm THF gelöst. Man kühlte auf –15° ab und fügte 540 mg *Chlorameisensäure-äthylester*, gelöst in etwas THF, hinzu. Nach 10 Min. wurden 2.27 g L-Phe-OChin·2HBr, erhalten aus der Carbobenzoxyverbindung durch Abspaltung des Z-Restes mit HBr/Eisessig, zugegeben. Unter Rühren ließ man langsam auf 0° kommen und stellte über Nacht in den Eisschrank. Am nächsten Tage wurde der Niederschlag abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst, worauf mit verd. Salzsäure, gesätt. *Natriumhydrogencarbonatlösung* und Wasser gewaschen, mit *Natriumsulfat* getrocknet und i. Vak. eingedampft wurde. Kristallisation erfolgte beim Verreiben mit Petroläther. Ausb. 2 g (74%), Schmp. 84–91°. Nach 4maligem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff/Petroläther Schmp. 130–131°, starkes Sintern bei 100°.

C₃₂H₃₃N₃O₅ (539.6) Ber. C 71.22 H 6.16 N 7.79 Gef. C 70.65 H 6.35 N 7.72

Die Verbindung zersetzte sich bei Raumtemp. innerhalb weniger Wochen zu einem gelben Öl.

Zur *Tripeptidsynthese* wurden je 0.1 mMol von Z-L-Leu-L-Phe-OChin und H-L-Val-OtBu in 1.5 ccm absol. THF 44 Stdn. auf 40° erwärmt. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

4. *Vinylester*: Die Versuche wurden schon beschrieben⁴⁾.

5. *Thiophenylester*

Z-L-Leu-L-Phe-SC₆H₅ aus L-Phe-SC₆H₅·HBr: Zu 0.88 g Z-L-Leu-OH und 0.33 g *Triäthylamin* in 20 ccm THF ließ man bei –15° 0.36 g *Chlorameisensäure-äthylester*, gelöst in 5 ccm THF, unter Rühren zutropfen. Nach 10 Min. bei –15° wurden 1.13 g L-Phe-SC₆H₅·HBr und 0.33 g *Triäthylamin* zugefügt. Nach 1 Stde. bei –15° und 30 Min. bei 20° wurde i. Vak. eingedampft, in Essigester aufgenommen, mit Wasser gewaschen, mit *Natriumsulfat* getrocknet und eingedampft. Ausb. 54%, Schmp. 150° (Essigester/Petroläther).

C₂₉H₃₂N₂O₄S (504.6) Ber. C 69.03 H 6.27 N 5.55 Gef. C 68.95 H 6.44 N 5.16

Zum *Racemisierungstest* wurden je 0.2 mMol Z-L-Leu-L-Phe-SC₆H₅ und H-L-Val-OtBu in 1.5 ccm THF 23 Stdn. auf 40° erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der allgemeinen

Vorschrift. Mit der Rohsubstanz ergab sich 2.7% *D-Phe*, mit der umkristallisierten hingegen kein solches.

Z-L-Leu-L-Phe-SC₆H₅ aus *Z-L-Leu-L-Phe-OH* und *Thiophenol*: 5 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* und 25 mMol *Thiophenol* wurden in 20 ccm THF gelöst und auf 0° abgekühlt. Unter Rühren ließ man 5 mMol *DCCI*, gelöst in 10 ccm THF, innerhalb 10 Min. zutropfen. Nach 2 Stdn. bei 0° wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft, sodann in kaltem Essigester aufgenommen, klar filtriert und eingedampft. Mit Petroläther wurde der *Z-Dipeptid-thiophenylester* gefällt. Ausb. 63%, Schmp. 149–150°.

Im Racemisierungstest (vgl. oben) zeigte die Rohsubstanz 1.8% *D-Phe*, die umkristallisierte keines.

6. *p-Nitro-phenylester*: Die Versuche wurden schon beschrieben⁴⁾.

7. *Äthoxyacetylen*: Je 0.125 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* und *H-L-Val-OtBu* wurden in 1 ccm „nassem Essigester“ gelöst. Dazu gab man ca. 50 mg *Äthoxyacetylen* und ließ im ersten Versuch 24 Stdn. bei 20° stehen, im zweiten erhitzte man 1 Stde. auf 80°. Da sich, vor allem beim 20°-Versuch, nicht alles aktivierte Produkt zum Tripeptidderivat umgesetzt hatte, wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 1 ccm Methanol gelöst. Dazu gab man 0.5 ccm 1*n* NaOH, wobei schwache Erwärmung eintrat. Nach 5 Min. wurde mit 10 ccm Wasser verdünnt, das Methanol i. Vak. abdestilliert und das Öl in Essigester aufgenommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

8. *Carbonyldiimidazol*: Zu 0.1 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* in 1 ccm absol. THF gab man bei Raumtemp. 20 mg *N,N'-Carbonyl-diimidazol* und verschloß den Kolben mit einem Calciumchloridrohr. Nach beendeter Gasentwicklung wurden 0.1 mMol *H-L-Val-OtBu* zugefügt. Anderntags wurde i. Vak. eingedampft und nach der allgemeinen Vorschrift weiterverarbeitet.

9. *Woodward's Reagens K*: 0.125 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* in 2 ccm Acetonitril wurden bei 0° mit 0.125 mMol *Woodward's Reagens K* (*N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3-sulfonat) versetzt. Sobald sich unter Rühren alles gelöst hatte, gab man 0.125 mMol *H-L-Val-OtBu* in 0.8 ccm Acetonitril zu und ließ bei Raumtemp. 22 Stdn. stehen. Die Weiterverarbeitung folgte der allgemeinen Vorschrift.

10. *Methode nach Patchornik*: 0.125 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH*, 0.375 mMol *Triäthylamin* und 0.125 mMol *L-Val-OtBu·HCl* wurden in 2 ccm THF gelöst. Dazu gab man bei 0° 0.125 mMol *N-Brom-succinimid* und ließ 10 Min. bei 0° stehen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

11. *Gemischte Anhydride*: Die Lösung von je 0.125 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* und *Triäthylamin* wurde auf –35° abgekühlt. Nach Zugabe von 0.125 mMol *Chlorameisensäure-äthylester* in 1 ccm absol. THF (auf –35° gekühlt) ließ man den Ansatz auf –10° aufwärmen, beließ 10 Min. bei dieser Temperatur, kühlte wieder auf –35° ab und fügte die ebenfalls gekühlte Lösung von 0.125 mMol *H-L-Val-OtBu* in 0.5 ccm THF hinzu. Nach einigen Minuten bei –35° wurde ca. 2 Stdn. im Eis/Kochsalzbad bei –10° gehalten und über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

12. *Carbonylditriazol*: Der Versuch wurde analog 8. ausgeführt.

13. *Dicyclohexylcarbodiimid*: Je 0.125 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* und *H-L-Val-OtBu* wurden in 0.5 ccm absol. THF bei –10° mit 0.125 mMol *DCCI* in 0.5 ccm THF versetzt. Nach den in der Tab. angegebenen Zeiten (bei –10° bzw. +20°) filtrierte man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und verarbeitete nach der allgemeinen Vorschrift weiter.

14. *1-Äthyl-3-[3-dimethylamino-propyl]-carbodiimid*⁴⁴⁾: Der Versuch wurde analog 13. in Acetonitril vorgenommen.

15. *[tert.-Butyl-äthinyl]-dimethylamin*: Dieser Versuch ist bereits beschrieben worden⁶⁾.

16. *Phosphoazomethode*: 0.25 mMol *L-Val-OtBu* wurden in 0.5 ccm absol. Pyridin bei 0° mit 0.125 mMol *Phosphoroxchlorid* in 1 ccm Pyridin versetzt. Nach 30 Min. bei Raumtemp. wurden 0.25 mMol *Z-L-Leu-L-Phe-OH* zugefügt, worauf 3 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt wurde. Die Weiterverarbeitung folgte der allgemeinen Vorschrift.

⁴⁴⁾ Das Präparat verdanken wir Herrn Prof. J. C. Sheehan.