

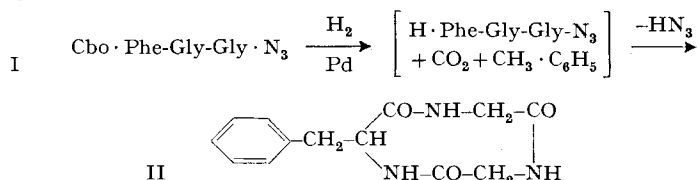
**231. Verdoppelungsreaktionen beim Ringschluss von Peptiden.
II. Cyclo-glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl. Verwendung aktivierter Ester zur Synthese makrocyclischer Peptide. Molekulargewichtsbestimmungen in Dimethylsulfoxyd**

8. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide¹⁾

von **R. Schwyzer** und **P. Sieber**

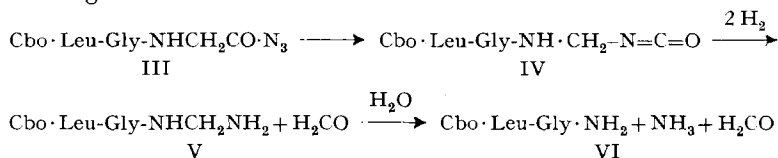
(5. IX. 58)

Vor einigen Jahren haben WINITZ & FRUTON²⁾ durch katalytische Hydrierung von Carbobenzoxy-DL-phenylalanyl-glycyl-glycinazid (I) in Essigester ein Produkt erhalten, welches sie als cyclo-Glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl (II) ansprachen:



Die Substanz war amorph. Smp. 177–179°, löslich in Methanol, Äthanol, Eisessig und heissem Wasser. Die Elementaranalyse für C und H stimmte vorzüglich, dagegen war der gefundene N-Wert (DUMAS) etwas niedrig. Das Verhältnis von Glycin zu Phenylalanin im Hydrolysat wurde wie 1,9:1 gefunden. Amino-N konnte nach VAN SLYKE nicht nachgewiesen werden; mit Ninhydrin entstand keine, mit Pikrinsäure in Natriumcarbonatlösung dagegen eine beständige, orangerote Färbung.

HEYNS, WALTER & MÜLLER³⁾ versuchten, eine ähnliche Reaktion zur Cyclisierung von Carbobenzoxy-leucyl-glycyl-glycinazid (III) zu verwenden, erhielten aber als Hauptprodukte Carbobenzoxy-leucyl-glycinamid (VI), Formaldehyd und Ammoniak. Diese Verbindungen waren sehr wahrscheinlich durch Umlagerung des Säureazids III, katalytische Hydrierung des entstandenen Isocyanats IV und Verseifung des Aminomethylamids V während der Aufarbeitung entstanden:



¹⁾ 7. Mitt. Helv. **41**, 2186 (1958).

²⁾ M. WINITZ & J. S. FRUTON, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3041 (1953).

³⁾ K. HEYNS, W. WALTER & F. MÜLLER, Angew. Chem. **68**, 617 (1956).

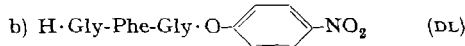
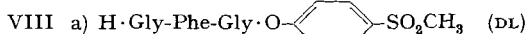
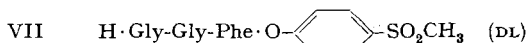
Nachdem wir mit der Verwendung von aktivierten Estern zur Cyclisierung von Polypeptiden gute Erfahrungen gemacht hatten⁴⁾, versuchten wir nun auch, das FRUTON'sche c-Tripeptid (II) mit dieser Methode herzustellen. Dabei wurde gefunden, dass sich ausser den bisher verwendeten, auch noch andere Kombinationen von N-Schutzgruppen und aktivierten Carboxylgruppen eignen, um durch selektive Abspaltung der N-Schutzgruppe aktivierte Ester von Peptiden mit freien oder protonisierten Aminogruppen zu erhalten. Die von uns bisher verwendeten Kombinationen sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. $R \cdot NH \sim \sim \sim COOR' \longrightarrow X^{\ominus} H_3N^{\oplus} \sim \sim \sim COOR'$

R	-OR'	Selektive Abspaltung von R
	-OCH ₂ CN ⁴⁾ -O--NO ₂ ⁴⁾	HCl in CH ₃ CN (80°); HCl in ws. Essigsäure (20°); F ₃ C·COOH + H ₂ O (-5°).
	-S·CH ₂ ·COOH ⁴⁾ -O--NO ₂	HBr in CH ₃ COOH (20°)
	-O--SO ₂ CH ₃	H ₂ , Pd in Methanol + HCl

Die N-Tritylgruppe lässt sich mit Chlorwasserstoff in Acetonitril, mit Salzsäure in wässriger Essigsäure und mit wässriger Trifluoressigsäure aus Cyanmethylestern und aus p-Nitrophenylestern⁴⁾ leicht selektiv entfernen. Die Carbobenzyloxygruppe lässt sich mit HBr in Eisessig aus Carboxymethyl-thioestern und p-Nitrophenylestern abspalten; besonders günstig ist ihre Kombination mit einem p-Methansulfonyl-phenylester, da hier katalytische Hydrierung zur Abspaltung verwendet werden kann.

Nach diesen Methoden wurden Salze folgender aktivierter Ester von Tripeptiden hergestellt und der Cyclisierung in Pyridin unterworfen:



Alle vier Verbindungen ergaben dasselbe, in flachen Nadeln kristallisierte cyclo-Polypeptid. Die Elementaranalyse ergab die Summenformel $(C_{13}H_{15}O_3N_3)_n$.

⁴⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, Helv. **39**, 872 (1956) und spätere Mitt. über homodet cyclische Polypeptide, vgl. ¹⁾.

das Verhältnis von Glycin zu Phenylalanin betrug 2,1:1 (Mittel aus 4 Bestimmungen). Die Verbindung ist in gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln und Wasser schwerlöslich (Kristallisation aus siedendem Eisessig), schmilzt bei 300° (unter Zers.); keine Farbreaktion mit Ninhydrin und mit Pikrinsäure-Soda, Biuretreaktion violett.

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde kryoskopisch in Dimethylsulfoxyd ausgeführt. Wie wir fanden, eignet sich dieses Lösungsmittel in ausgezeichneter Weise für die Kryoskopie. Es besitzt einen Smp. von $18,5^{\circ}$ und ein gutes Lösungsvermögen für die verschiedensten Verbindungen. Die molare Gefrierpunktserniedrigung für Carbobenzoxy-glycyl-glycin beträgt $4,99^{\circ}$ (Mittel aus 5 Messungen im Konzentrationsbereich 0,0025–0,025-m., vgl. Fig. 1). Auf diese Weise wurde das Molekulargewicht unseres kristallisierten c-Peptides zu 508 bestimmt (Mittel aus 2 Serien zu 2 und 3 Werten, vgl. Fig. 1 und Tab. 2, ber. 522).

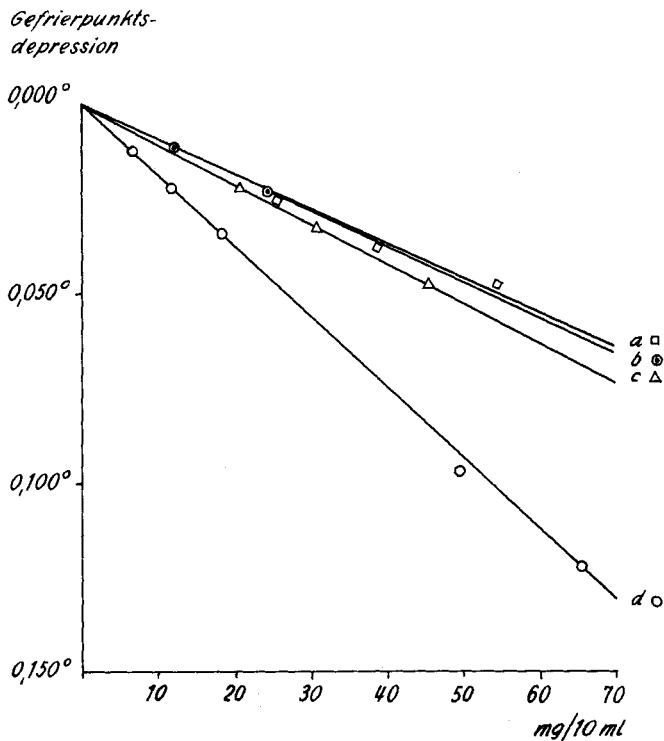


Fig. 1

Gefrierpunktserniedrigungen in Dimethylsulfoxyd. a) Cyclisierungsprodukt von VII; b) X; c) Cyclisierungsprodukt von VIII; d) Carbobenzoxy-glycyl-glycin

Um dieses Molekulargewicht genauer vergleichen zu können, wurde auch das Hexapeptidderivat IX cyclisiert. Es entstand ein ebenfalls kristallisiertes c-Peptid X, Smp. 312° (unter Zers.), welches sich analytisch nicht von den

aus den Tripeptidderivaten (VII und VIII) hergestellten unterscheiden liess. Für X wurde kryoskopisch ein Molekulargewicht von 531 (ber. 522) bestimmt:

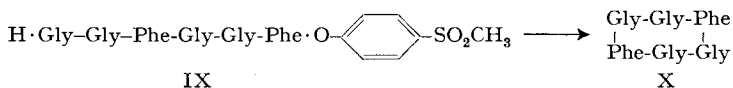


Tabelle 2. *Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen in Dimethylsulfoxyd*

mg Einwaage auf 10 ml	Gefrier- punkts- erniedri- gung °C	ΔT° für 10 mg	Mittelwert für $\Delta T^\circ/10$ mg	Substanz und Molekulargewicht
6,7 11,8 18,4 49,4 65,4	0,012 0,022 0,034 0,097 0,122	0,0179 0,0186 0,0185 0,0196 0,0187	0,0187	Carbobenzoxy-glycyl- glycin 266,3 ber.
12,40 24,43	0,011 0,023	0,00887 0,00940	0,00914	546 gef.
21,0 31,0 45,5	0,022 0,033 0,048	0,01048 0,01064 0,01055	0,0106	Cyclisierungsprodukt von VII und VIII. 470 gef.
25,8 39,3 54,5	0,025 0,038 0,048	0,00970 0,00967 0,00881	0,00939	X 531 gef.

Bei der Cyclisierung der Tripeptidderivate VII und VIII treten also zwei Molekeln zu einem cyclischen Hexapeptid zusammen, welches als einziges Cyclisierungsprodukt isoliert werden konnte. Das IR.-Spektrum von X in KBr zeigt starke Banden bei 3310 ($> \text{NH}$), 1691, 1668, 1643 (Amid I) und 1535 und 1529 cm^{-1} (Amid II).

Obwohl nicht zu erwarten wäre, dass bei der Cyclisierung von VII und VIII (DL-Formen) einerseits und von IX (unbekanntes Diastereomeren-gemisch) andererseits dasselbe cyclo-Hexapeptid entstehen würde, so scheint doch nach Kristallisation aus Eisessig in beiden Fällen dasselbe Diastereomere in überwiegender Menge (neben verschiedenen andern Begleitern) vorzuliegen.

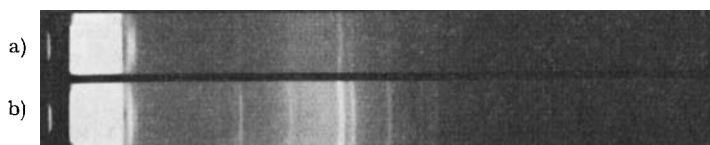


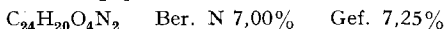
Fig. 2

DEBYE-SCHERRER-Diagramme der Cyclisierungsprodukte aus den Tripeptiden VII und VIII (a) und aus dem Hexapeptid IX (b). Aufnahmen mit GUINIER-Kamera, $\varnothing 214$ mm, $\text{Cu-K}\alpha$ -Strahlung.

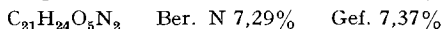
Die DEBYE-SCHERRER-Diagramme (Fig. 2) beider Cyclisierungsprodukte weisen denn auch gleiche Reflexe, entsprechend Netzebenenabständen von $16,0/7,3/7,1/5,6/5,5/4,85/4,65/4,50/4,00/3,65/3,60/3,55/\text{\AA}$, auf. Daneben geben beide Verbindungen verschiedene andere, sehr schwache Reflexe. Zur Zeit sind wir mit der Untersuchung dieser Erscheinung, welche vielleicht die bevorzugte Entstehung einer einzigen der beiden diastereomen Formen (Racemat oder meso-Form) bedeutet, beschäftigt.

Experimenteller Teil

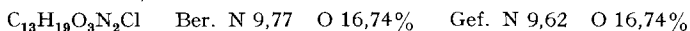
Carbobenzoxy-DL-phenylalanin-p-cyanphenylester: 500 mg Carbobenzoxy-DL-phenylalanin und 570 mg Di-(p-cyanphenyl)-sulfid⁵⁾ wurden in 2,5 ml Pyridin 7 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch wurde auf kalte 1-n. Salzsäure gegossen, das Öl mit Äther aufgenommen und mit Wasser, verd. 1-n. Natronlauge und Wasser (eiskalt) gewaschen. Nach Trocknen und Verdampfen hinterblieben 660 mg Öl, welches aus Äther-Petroläther kristallisiert wurde (610 mg; 91%; Smp. 88,5–89°). Trocknen 5 Std. bei $20^{\circ}/10^{-2}$ Torr. über P_2O_5 .



Carbobenzoxy-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester: 115 mg Carbobenzoxy-DL-phenylalanin-p-cyanphenylester, 45 mg Glycin-äthylester-hydrochlorid, 0,2 ml Tetrahydro-furan, 0,1 ml Triäthylamin und eine Spur Eisessig wurden zusammen 7 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Mischung wurde darauf mit Wasser verrieben, wobei das Dipeptid-Derivat auskristallisierte. Dieses wurde abgenutscht und mit verdünntem Ammoniak und Wasser gewaschen (95 mg; 86%, Smp. 98–99°). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff, Smp. 100–100,5°. Trocknen 3 Std. bei $80^{\circ}/10^{-2}$ Torr.



DL-Phenylalanyl-glycin-äthylester-hydrochlorid: 80 mg Carbobenzoxy-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester wurden in der üblichen Weise (1 ml Methanol, 0,2 ml 1-n. HCl und 10 mg 10-proz. Palladium-Kohle) hydriert. Die vom Katalysator befreite Lösung hinterliess nach dem Verdampfen 60 mg eines farblosen Öles, welches aus Essigester kristallisiert und umkristallisiert wurde. Feine farblose Kristallnadeln. Smp. 152–153° (50 mg; 84%). Trocknen 3 Std. bei $80^{\circ}/10^{-2}$ Torr.



*Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester*⁶⁾: 500 mg DL-Phenylalanyl-glycin-äthylester-hydrochlorid, 455 mg Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester, 0,7 ml Tetrahydro-furan, 0,61 ml Triäthylamin und eine Spur Eisessig wurden vermischt und 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe von 6 ml Wasser wurde ein rasch kristallisierendes Öl erhalten. Die Verbindung wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet: 610 mg (79%); Smp. 128,5–129°. Umkristallisieren aus Essigester ergab ein Präparat mit Smp. 130–130,5°⁶⁾, welches weiter verwendet wurde.

*Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin*⁷⁾: 6,43 g Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester wurden in 100 ml Dioxan gelöst und mit 32 ml 0,5-n. NaOH versetzt. Nach $\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Es wurden 5,7 g Säure erhalten, welche aus Essigester umkristallisiert wurden: 4,98 g (83%), Smp. 143–144°.

⁵⁾ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 373 (1957).

⁶⁾ J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 676 (1952), und frühere Arbeiten. Diese Autoren geben Smp. 131–132°, 132–134° und 134–135° für verschiedene Präparate an.

⁷⁾ G. W. KENNER & R. J. STEDMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2069 (1957), wo Smp. 141–142° angegeben wird.

Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-p-methansulfonylphenylester: 500 mg Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin und 600 mg Di-(p-methansulfonylphenyl)-sulfid⁵⁾ wurden in 4 ml Pyridin gelöst und 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Der Ansatz wurde darauf mit eiskalter 1-n. HCl verrieben; das feste Material wurde mit Essigester aufgenommen und mit verd. HCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknen und Verdampfen der Lösung wurde der Rückstand mit Äther verrieben: 550 mg krist. Substanz (80%), Umkristallisieren aus Aceton-Äther, Smp. 161–162,5°, Trocknen 2 Std. bei 100°/10⁻² Torr.

$C_{28}H_{29}O_8N_3S$ Ber. C 59,25 H 5,15 O 22,55%
Gef. „ 59,57 „ 5,14 „ 22,37%

Wurde bei der Aufarbeitung zur Entfernung von überschüssigem p-Methansulfonylphenol kaltes, wässriges Ammoniak verwendet, so liessen sich regelmässig grössere Mengen Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycinamid isolieren. Farblose Nadeln aus Essigester, Smp. 161,5–162° (Misch-Smp. mit dem aktivierten Ester 146–155°). Trocknen 3 Std. bei 90°/10⁻² Torr.

$C_{21}H_{24}O_5N_4$ Ber. N 13,58% Gef. N 13,71%

Glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-p-methansulfonylphenylester-hydrochlorid (VIIIa):

550 mg Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-p-methansulfonylphenylester wurden in 10 ml Methanol + 1 ml 1-n. HCl mit Palladiumkohle und Wasserstoff hydriert (Absorption von CO₂ in Lauge). Nach 2¾ Std. betrug die Wasserstoffaufnahme 20 ml (ber. 20 ml) und blieb konstant. Nach Entfernung vom Katalysator und Lösungsmittel wurde ein farbloses Öl erhalten, welches in abs. Äthanol gelöst und mit Äther als festes, hygroscopisches Pulver gefällt werden konnte. 429 mg (94%).

Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-p-nitrophenylester: 500 mg Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin und 500 mg Di-(p-nitrophenyl)-sulfid⁵⁾ wurden in 4 ml Pyridin gelöst und 19 Std. bei Z. T. aufbewahrt. Darauf wurde auf eiskalte 1-n. HCl gegossen und die feste Fällung abgentscht. Diese wurde mit Essigester verrieben, wobei sie kristallisierte (340 mg, Smp. 171–172°). Die Mutterlauge ergab nach dem Trocknen und Einengen weitere 135 mg derselben Verbindung (Smp. 171–172°), insgesamt 475 mg (73%). Beim Umkristallisieren aus Aceton-Äther veränderte sich der Smp. nicht. Trocknen 2 Std. bei 100°/10⁻³ Torr. Beim Verreiben mit verdünnter NaOH geht die Verbindung mit gelber Farbe in Lösung (Hydrolyse).

$C_{27}H_{26}O_8N_4$ Ber. O 23,95% Gef. O 23,68%

Glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-p-nitrophenylester-hydrobromid (VIIIb-HBr): 490 mg Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-p-nitrophenylester wurden in 5 ml 1,6-n. HBr in Eisessig gelöst. Nach 1¼ Std. bei Zimmertemperatur hatte die CO₂-Entwicklung am zugesetzten Siedestein aufgehört. Die Lösung wurde i. V. verdampft und der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben; in Äther unlösliches braunes Pulver, welches sich leicht in Wasser löst und mit NaOH eine Gelbfärbung ergab. 400 mg (92%).

Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-DL-phenylalanin-p-methansulfonylphenylester: 4,54 mg Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-DL-phenylalanin⁸⁾ (Herstellung siehe unten) und 5,5 g Di-(p-methansulfonylphenyl)-sulfid⁵⁾ wurden in 45 ml Pyridin gelöst und nach 21 Std. bei Zimmertemperatur auf verdünnte HCl gegossen. Die ölige Ausscheidung wurde in Essigester-Benzol (1:1) aufgenommen und mit verd. HCl, Wasser, eiskalter Sodalösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Trocknen und Verdampfen ergaben 4,77 g schaumiges Material, welches in 50 ml Methanol gelöst wurde und nach Zugabe von 10 ml 1-n. HCl auskristallisierte: 3,6 g (57%), Smp. 89–90°. Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol umkristallisiert, Smp. 90–92°. Trocknen 5 Std. bei 60°/10⁻² Torr.

$C_{28}H_{29}O_8N_3S$ Ber. N 7,40% Gef. 7,41%

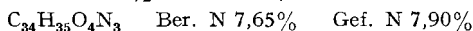
Glycyl-glycyl-DL-phenylalanin-p-methansulfonylphenylester-hydrochlorid (VII-HCl): 4,5 g Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-DL-phenylalanin-p-methansulfonylphenylester wurden in 75 ml Methanol und 10 ml 1-n. HCl in üblicher Weise hydriert. Nach Aufnahme der be-

⁸⁾ Vgl. TH. WIELAND & R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. 569, 122 (1950).

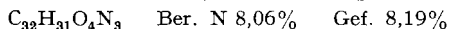
rechneten Menge H_2 wurde vom Katalysator und Lösungsmittel befreit und der Rückstand in heissem abs. Äthanol gelöst. Beim Abkühlen fiel ein farbloses hartes Harz aus: 3,73 g (100%).

Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester: 11,9 g DL-Phenylalanyl-glycin-äthylester-hydrochlorid wurden mit 17 ml Tetrahydro-furan, 14,4 ml Triäthylamin, 16,3 g Trityl-glycin-cyanmethylester und 0,25 ml Eisessig über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 250 ml Wasser wurde das ausgefällte Öl mit Essigester aufgenommen und mit Citronensäurelösung, 1-n. Natronlauge und Wasser gründlich gewaschen. Nach Trocknen und Verdampfen der Essigester-Lösung wurde der Rückstand aus Tetrachlorkohlenstoff-Äther kristallisiert, 13,54 g (60%), Smp. 149–149,5°. Aus der Mutterlauge konnten durch Chromatographie an Aluminiumoxyd 20% der eingesetzten Menge am Trityl-glycin-cyanmethylester zurückgewonnen werden.

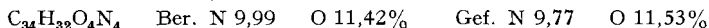
Nach Kristallisation aus Methanol (kl. farblose Prismen) schmolz das Tripeptid-Derivat bei 153–154°. Trocknen 2 1/2 Std. bei 90°/10⁻² Torr.



Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin: 11,08 g Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester wurden in 110 ml Dioxan gelöst und mit 23 ml 1-n. NaOH und 20 ml Wasser versetzt. Nach 2 1/2 Std. bei Zimmertemperatur und 1/2 Std. bei 36° wurde das Dioxan i. V. verdampft, der Rückstand mit Wasser verdünnt und in der Kälte mit Citronensäure-Lösung angesäuert. Die gallertige Fällung wurde in Essigester aufgenommen, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das nach Verdampfen des Lösungsmittels verbleibende Material wurde aus CCl_4 und Benzol umkristallisiert, 9,95 g (95%) sehr feine, farblose Kristallnadeln. Trocknen 2 1/2 Std. bei 80°/10⁻² Torr., Smp. 130–132°.



Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-cyanmethylester: 100 mg Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin wurden mit 0,1 ml Triäthylamin und 0,15 ml Chloracetonitril versetzt und 23 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Gemisch wurde in Essigester aufgenommen und mit Wasser, verd. Citronensäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Der nach dem Trocknen und Verdampfen hinterbleibende Rückstand kristallisierte beim Auskochen mit Äther. 95 mg (88,5%), Smp. 162,5–164°. Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther, Smp. 164–165,5°. Trocknen 2 Std. bei 100°/10⁻² Torr.

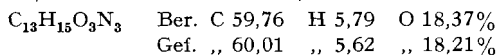


Glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-cyanmethylester-hydrochlorid (VIII c-HCl): 280 mg Trityl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-cyanmethylester wurden in der Siedehitze in 1 ml Acetonitril gelöst und mit 0,52 ml 2,88-n. HCl in Acetonitril versetzt. Nach 4 Min. wurde das Lösungsmittel i. V. verdampft und der Rückstand mit Äther ausgekocht und verrieben. Hygroskopisches Pulver. Das Äther-Filtrat enthielt 127 mg (91%) Triphenyl-chlor-methan. Das Tripeptid-cyanmethylester-hydrochlorid konnte bisher nicht kristallisiert werden und wurde in amorpher Form zur Cyclisierung verwendet.

Cyclisierung der Tripeptid-Derivate wie üblich⁴⁾ durch Eintropfen einer Lösung der aktivierten Ester der Peptid-hydrohalogenide in Dimethylformamid in Pyridin (95°).

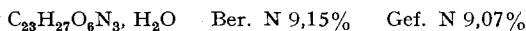
Ausgangsmaterial	VII-HCl	VIII a-HCl	VIII b-HBr	VIII c-HCl
Ausbeute ⁹⁾	25%	40–46%	29–38%	20%

Alle erhaltenen Cyclisierungsprodukte erwiesen sich als identisch. Kristallisation aus Methanol-Wasser und aus Eisessig: feine farblose, flache Nadeln, Smp. ca. 300° u. Zers. (Braunfärbung ab 290°). Trocknen 3 Std. bei 90°/10⁻³ Torr.



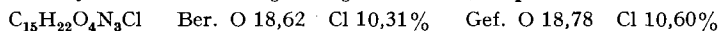
⁹⁾ Die Ausbeute bezieht sich auf Rohkristalliat nach Reinigung über Ionenaustauschern mit Methanol-Wasser (1:1).

Cbo·Gly-Gly-Phe·OEt (DL): Aus 3 g DL-Phenylalanin-äthylester-hydrochlorid wurde mit der berechneten Menge Na-Methylat der freie Ester hergestellt. Dazu wurden 3,6 g Cbo·Gly-Gly·OH und 20 ml Acetonitril gegeben, auf 0° gekühlt und mit 3,24 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Unter Rühren liess man noch 3 Std. bei 0°, dann über Nacht bei Zimmertemperatur reagieren. Nach dem Versetzen mit wenig Eisessig wurde der ausgefallene Harnstoff abgenutscht. Das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Man erhielt 4,96 g Cbo·Gly-Gly-Phe·OEt (= 86%), Smp. 101–102°. Zur Analyse wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Smp. 105°.

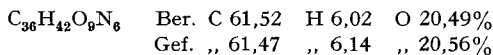


Cbo·Gly-Gly-Phe·OH (DL)⁸⁾: 5 g Cbo·Gly-Gly-Phe·OEt wurden in 200 ml Dioxan und 25 ml Methanol gelöst, mit 27 ml 0,5-n. NaOH versetzt und 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser gelöst und bei 60° langsam mit 2-n. HCl angesäuert. Das auskristallisierte Cbo·Gly-Gly-Phe·OH wurde nach einigen Std. Stehen bei 0° abgenutscht, 3,3 g (70%), Smp. 128–129°⁸⁾.

HCl·H·Gly-Gly-Phe·OEt (DL): 4,2 g Cbo·Gly-Gly-Phe·OEt wurden in 100 ml Methanol und 10,1 ml 1-n. HCl gelöst und in Gegenwart von 450 mg 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Das entstehende CO₂ wurde mit NaOH absorbiert. Nachdem 225 ml Wasserstoff aufgenommen waren, kam die Hydrierung zum Stillstand. Der Katalysator wurde abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockene verdampft; 3,26 g (= 100%). Zur Analyse wurde noch zweimal in heissem abs. Äthanol gelöst und mit abs. Essigester versetzt. Das Hydrochlorid fiel als gallertige Masse aus, Smp. 139–140°.



Cbo·(Gly-Gly-Phe)₂·OEt (DL)₂: Die Lösung von 4,75 g Cbo·Gly-Gly-Phe·OH⁸⁾ in 50 ml Dimethylformamid und 1,7 ml Triäthylamin wurde auf –10 bis –15° gekühlt und mit 1,14 ml Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Nach 10 Min. wurde eine Suspension von 4,5 g HCl·H·Gly-Gly-Phe·OEt in 25 ml Dimethylformamid und 1,9 ml Triäthylamin zugegeben. Anschliessend liess man noch 1 Std. bei Zimmertemperatur und 5 Min. bei 60° stehen. Darauf wurde die Lösung im Vakuum stark eingeeengt, der Rückstand einige Male mit Wasser verrieben und dann getrocknet. Zuletzt wurde mit Essigester ausgekocht, wobei Kristallisation eintrat. Das Produkt wurde aus Dioxan-Wasser umkristallisiert: 5,33 g (66%), Smp. 174–176°. Zur Analyse wurden ebenfalls aus Dioxan-Wasser umkristallisiert, Smp. 180–181°.



Dasselbe Produkt wurde auch mittels Dicyclohexyl-carbodiimid erhalten, doch war die Ausbeute kleiner und das Hexapeptid war nur schwierig vom Harnstoff zu trennen.

Cbo·(Gly-Gly-Phe)₂·OH (DL)₂: 6,0 g des Äthylesters wurde in 240 ml Dioxan und 30 ml Methanol gelöst, mit 34 ml 0,5-n. NaOH versetzt und 50 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit 2-n. HCl angesäuert und noch mit Kochsalz gesättigt. Das ausgefallene Öl wurde in Essigester:Methanol (8:2) gelöst und die wässrige Lösung noch achtmal mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde nach dem Trocknen stark eingeeengt, wobei eine Fällung entstand. Diese wurde nach Zusatz von Äther abgenutscht, 5,16 g (90%).

Cbo·(Gly-Gly-Phe)₂·OC₆H₄SO₂CH₃ (p) (DL)₂: 3,44 g Cbo·(Gly-Gly-Phe)₂·OH wurden in 13,5 ml Dimethylformamid und 2,55 ml Pyridin gelöst, mit 6 g Di-(p-Methansulfonylphenyl)-sulfid versetzt und 15 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschliessend wurde 2-n. HCl bis pH 1 zugegeben und 1 Std. stehengelassen. Nach dem Dekantieren wurde das Harz mit Wasser verrieben bis neutral, dann im Vakuum bei 70° getrocknet. Der Rückstand wurde mit Äther und Essigester verrieben, wobei das Produkt fest wurde: 4,18 g (99%).

$HCl \cdot H \cdot (Gly-Gly-Phe)_2 \cdot OC_6H_4SO_2CH_3$ (DL)₂ (IX-HCl): 4,92 g Cbo·(Gly-Gly-Phe)₂·OC₆H₄SO₂CH₃ wurden in 500 ml Methanol, 25 ml Wasser und 7 ml 1-n. HCl suspendiert und mit Hilfe von 10-proz. Pd-Kohle hydriert. Das sich bildende CO₂ wurde mit NaOH absorbiert. Nachdem alles Ausgangsmaterial in Lösung gegangen war und 138 ml Wasserstoff aufgenommen worden waren, wurde der Katalysator abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockene verdampft, 4,1 g (95%).

Cyclo-Gly-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe (DL-DL): 4,1 g HCl·(Gly-Gly-Phe)₂·OC₆H₄SO₂CH₃ wurden in 80 ml Dimethylformamid und 4 ml Eisessig gelöst und in 5 Std. bei 95° in 820 ml Pyridin eingetropt. Anschliessend wurden noch 2 Std. bei der gleichen Temperatur gerührt, dann das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in Methanol-Wasser 1:1 warm gelöst, durch je eine Säule mit stark saurem und stark basischem Ionenaustauscher (MERCK I und III) filtriert, mit demselben Gemisch gut ausgewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit Aceton verrieben und abgenutscht: 380 mg (13%).

Zur weiteren Reinigung wurde das cyclo-Hexapeptid in viel Methanol-Wasser heiss gelöst, eingengt und kristallisieren gelassen. Umkristallisieren aus wenig Eisessig; flache, farblose Nadeln. Smp. ca. 300° (Zers.).

$C_{26}H_{30}O_6N_6$ Ber. C 59,76 H 5,79 N 16,08%
Gef. „ 59,86 „ 5,90 „ 16,08%

*Bestimmung des Molverhältnisses von Glycin und Phenylalanin in cyclo-Glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl*¹⁰⁾: Hydrolyse: Es wurden 31,5 mg trockene Substanz (3 Std. bei 90° getrocknet) eingewogen, in 3 ml eines Gemisches von konz. HCl/Eisessig (Vol.-Verhältnis 1:1) gelöst und 24 Std. bei 105° im Trockenschrank (Bombenröhrchen) hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde die klare Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 10 ml 0,1-n. HCl aufgenommen. 2 Tropfen Toluol wurden hinzugefügt und die Lösung im Eisschrank aufbewahrt.

Chromatographie: Das Hydrolysat wurde neben der Vergleichslösung auf WHATMAN-1-Papier absteigend (10 Std.) in einem Gemisch n-Butanol/Äthanol/Wasser 100:100:50 chromatographiert. Die Bogen wurden an der Luft getrocknet. Auf einem Bogen wurden jeweils 10 µl oder 20 µl des Hydrolysates und der Vergleichslösung aufgetragen. Eine Doppelbestimmung wurde durchgeführt. Vergleichslösung: 75 mg (1 mMol) Glycin und 82,5 mg (0,5 mMol) Phenylalanin wurden in 50 ml 0,1-n. HCl gelöst.

Analyse¹¹⁾: Die lufttrockenen Papierstreifen wurden in Ninhydrin-Reagens (0,5-proz. Ninhydrin-Lösung in einer Mischung von 93 Teile n-Butanol und 7 Teile Eisessig) gebadet. Es wurde 20 Min. an der Luft getrocknet und weitere 25 Min. im Trockenschrank auf 60° erhitzt. Darauf wurde mit Kupferreagens (2 ml gesättigte, wässrige Kupfernitratlösung, 0,4 ml 10-proz. HNO₃, auf 100 ml mit 96-proz. Äthanol aufgefüllt) besprüht. Die Flecken wurden markiert, ausgeschnitten und in Reagensgläsern mit je 5 ml Methanol innerhalb 15 Min. unter häufigem Schütteln extrahiert.

Chromatogramm	Glycin	Phenylalanin	Molverhältnis
1 (10 µl)	16,5 γ	18,1 γ	2 :1
2 (10 µl)	17,2 γ	16,5 γ	2,3:1
3 (20 µl)	15,0 γ	16,5 γ	2 :1
4 (20 µl)	16,5 γ	16,5 γ	2,1:1
Mittelwert: Molverhältnis Glycin:Phenylalanin = 2,1:1.			

¹⁰⁾ Die Aminosäureanalyse wurde in verdankenswerter Weise von Herrn Dr. H. ZUBER (CIBA AKTIENGESELLSCHAFT) ausgeführt.

¹¹⁾ Methode nach F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, Biochem. Z. **324**, 544 (1953).

Die Extinktion der Methanollösung wurde im Spektrophotometer gegen Methanol als Lösungsmittel gemessen. Die Extinktionswerte (E_{\max}) wurden durch graphische Ermittlung der Papierleerwerte korrigiert. Der Quotient aus der korr. Extinktion geteilt durch diejenige der Vergleichslösung, multipliziert mit der Substanzmenge (bzw. Konzentration) der Vergleichslösung ergibt die Menge (bzw. Konzentration) der Aminosäure im Hydrolysat.

Die Mikroanalysen wurden in unsern mikro-analytischen Laboratorien unter der Leitung von Dr. H. GYSEL ausgeführt. Die RÖNTGEN-Diagramme verdanken wir Herrn P. D. Dr. H. LABHARDT aus unserem Physiklaboratorium.

SUMMARY

New combinations of activated ester groupings with N-substituents are described for preparing activated esters of peptides which may be used for cyclization (to homodetic cyclic polypeptides). Various activated esters of glycyl-glycyl-DL-phenylalanine and glycyl-DL-phenylalanyl-glycine yield cyclo-glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl. These reactions present new examples for the «doubling reaction» during cyclization. The same cyclopolypeptide was obtained on cyclization of the p-methanesulfonylphenyl ester of glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanine, indicating that one of the diastereoisomers might be predominantly formed during the cyclization.

Dimethylsulfoxide has been found to be a useful solvent for the cryoscopic determination of molecular weights of cyclopolypeptides.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

232. Verdoppelungsreaktionen beim Ringschluss von Peptiden.

III. Cyclo-glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycyl

9. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide¹⁾

von R. Schwyzer und B. Gorup

(5. IX. 58)

Bei der Cyclisierung von Polypeptiden werden oft nicht die erwarteten, einfachen cyclo-Polypeptide, sondern Verbindungen mit doppeltem Molekulargewicht erhalten. Solche «Verdoppelungsreaktionen» sind bei der Cyclisierung von Tripeptid- und Pentapeptid-Derivaten beobachtet worden²⁾. Die Erscheinung lässt sich vielleicht stereochemisch auf Grund besonders begünstigter Konstellationen im Übergangs- und Endzustand erklären^{2b)}.

¹⁾ 8. Mitt. Helv. **41**, 2190 (1958).

²⁾ a) J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN & W. L. RICHARDSON, J. Amer. chem. Soc. **77**, 6391 (1955); b) R. SCHWYZER, P. SIEBER & B. GORUP, Chimia **12**, 90 (1958); R. SCHWYZER, Synthesis of Cyclic Polypeptides in «Amino Acids and Peptides with Antimetabolic & Cytotoxic Properties (a Ciba Foundation Symposium)», J. & A. Churchill Ltd., London 1958 (im Druck); R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. **41**, 2186, 2190 (1958).