

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).

BOISSONNAS & SCHUMANN beschrieben bereits 1952³⁾ ein Cyclisierungsprodukt von D-Leucyl-glycyl-glycin, welches als amorphe Verbindung erhalten und als cyclo-Glycyl-glycyl-D-leucyl (ein cyclo-Tripeptid) angesprochen wurde. Unsere Versuche zielten vorerst auf die Verwendung von aktivierten Estern für die Synthese des Antipoden dieser Verbindung ab. Wir fanden aber, dass dabei nicht das cyclo-Tripeptid, sondern unter Verdoppelung das cyclo-Hexapeptid cyclo-Glycyl-glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl erhalten wird. Dieselbe Verbindung wurde auch aus dem entsprechenden aktivierten Ester des offenkettigen Hexapeptides erhalten. Die Verbindung kristallisiert aus heissem Wasser in Form schön ausgebildeter, durchsichtiger und farbloser hexagonaler Plättchen vom Smp. 310–312° (Zers.). Sie dreht in Eisessig links, $[\alpha]_D^{25} = -44,4^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,312$), und zeigt im IR.-Spektrum (KBr) die in Tab. 1 aufgeführten Banden. Wie wir seit unserer ersten Veröffentlichung über diese Verbindung^{2b)} erfahren haben, haben auch HEXTALL, KENNER & TURNER dieselbe Verbindung über die p-Nitrothiophenylester des Glycyl-L-leucyl-glycins und des entsprechenden offenkettigen Hexapeptids hergestellt⁴⁾.

Tabelle 1. Wichtigste Banden des IR.-Spektrums von kristallisiertem cyclo-Glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycyl (VII) in KBr

Unser Präparat	Angaben von KENNER ⁴⁾	Unser Präparat	Angaben von KENNER ⁴⁾
3310 cm ⁻¹	3305 cm ⁻¹	1372 (m)	1375
3060	3060		1370
2940	2940	1336 (m)	1336
1682 (st)	1679 (st)	1289 (m)	1289
1668 (st)	1663 (st)	1255 (m)	1255
1649 (st)	1640 (st)	1245 (m)	1244
1536 (st)	1536 (st)	1158 (sw)	1160
1471 (m)	1469	1131 (sw)	—
1440 (m)	1437	1038 (sw)	—
—	1420	1019 (sw)	1020
1388 (m)	1385		

sw = schwach, m = mittel, st = stark (relative Intensität der Absorptionsbanden)

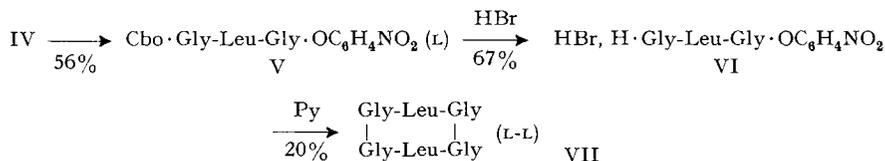
Die Identität der aus den Tripeptid- und dem Hexapeptid-Derivat erhaltenen Cyclisierungsprodukte wurde ausserdem durch das DEBYE-SCHERRER-Diagramm (Tab. 2) bewiesen⁵⁾.

³⁾ R. A. BOISSONNAS & I. SCHUMANN, *Helv.* **35**, 2229 (1952).

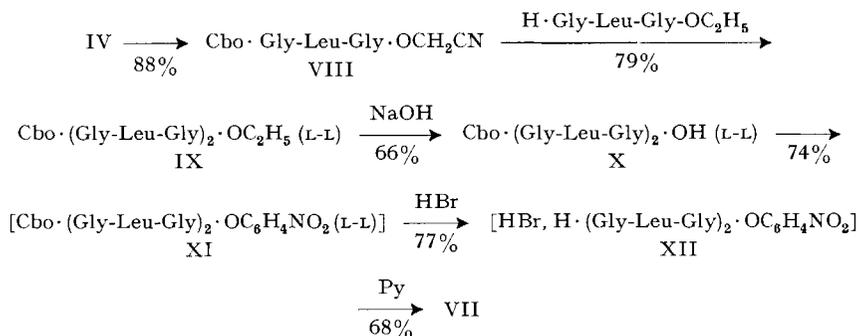
⁴⁾ Private Mitteilung von Prof. G. W. KENNER, der mir die Angaben über die IR.-Spektren und eine Substanzprobe in verdankenswerter Weise überlassen hat; vgl. M. GOODMAN & G. W. KENNER, *Advances in Protein Chemistry* **12**, 494 (1957).

⁵⁾ Identische Reflexe wurden nur nach gleichzeitiger Kristallisation der Verbindung erhalten; nach verschiedenartigem Trocknen oder Lagern werden die Diagramme verschieden. Das Kristall-Lösungsmittel ist nach Trocknen bei 110°/10⁻³ Torr während 4 Std. verschwunden.

in Eisessig¹¹⁾ abgespalten und das kristallisierte Hydrobromid VI in Pyridin¹²⁾ zum cyclo-Hexapeptid VII cyclisiert:



Der Aufbau von IV zu Hexapeptid-Derivaten und deren Cyclisierung zu VII erfolgte auf folgendem Wege über den Cyanmethylester VIII:



Die wichtigsten Daten der Verbindungen I–X sind in der Tab. 3 festgehalten.

Tabelle 3. Einige Daten der Verbindungen I–X

Substanz Nr.	Kristallisation aus	Smp.	Analyse					
			ber. %			gef. %		
			C	H	N	C	H	N
I	Essigester/P.-Ä.	100–102°	59,61	6,87	8,69	59,57	6,81	8,34
II	(Öl)	—	59,85	6,41	—	59,96	6,85	—
III	Essigester/P.-Ä.	105–107°	58,92	7,17	10,19	58,93	7,37	10,36
IV	Essigester/P.-Ä.	109–111°	56,95	6,64	11,09	56,76	6,76	11,14
V	Aceton-Äther	155–156°	57,59	5,63	11,29	57,58	5,96	11,38
VI	Aceton-Äther	112–115°	42,96	5,18	12,52	42,79	5,36	11,93
VII (aus VI)	Wasser	310–312° (Zers.)	52,82	7,54	18,49	52,94	7,80	18,64
VIII	Essigester/P.-Ä.	80–82°	57,40	6,26	13,39	57,33	6,52	13,14
IX	Methanol/Äther	186–188°	56,76	7,30	13,24	56,69	7,65	13,28
X	Methanol/Äther	155–158°	55,43	6,98	13,85	55,22	7,20	13,95
VII (aus XII)	Wasser	310–312° (Zers.)	52,82	7,54	18,49	52,90	7,83	18,65

¹¹⁾ D. BEN-ISHAÏ & A. BERGER, J. org. Chemistry **17**, 1564 (1952); D. BEN-ISBAÏ, *ibid.* **19**, 62 (1954); G. W. ANDERSON, J. BLODINGER & A. D. WELCHER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5309 (1952); vgl. auch R. SCHWYZER & P. SIEBER¹⁾.

¹²⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, Helv. **39**, 872 (1956).

Experimenteller Teil

*Carbobenzoxyglycin*¹³⁾: 42 g Glycin, 140 ml 4-n. NaOH und 95 g Chlorameisensäure benzylester ergaben 68,7 g (58%) Cbo·Gly·OH, Smp. 119–121° (aus Chloroform).

*Carbobenzoxyglycin-cyanmethylester*⁶⁾: 47,8 g Carbobenzoxyglycin (0,226 Mol), 48 ml Triäthylamin (0,343 Mol) und 44 ml Chloracetonitril (0,691 Mol) nach Literaturangabe verarbeiten. Ausbeute 50,04 g (88%), Smp. 67–69° umkrist. aus Essigester-Petroläther.

*Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin-äthylester*⁷⁾: 20,0 g (0,086 Mol) Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester, 15,8 g (0,081 Mol) L-Leucin-äthylester-hydrochlorid, 13,6 ml (0,097 Mol) Triäthylamin, 0,4 ml Eisessig und 58 ml Tetrahydro-furan 48 Std. bei Zimmertemperatur stehenlassen. Zugabe von wenig Wasser (bis Salze gelöst sind), $\frac{1}{2}$ Std. rühren, Zugabe von viel Wasser, ausziehen mit Essigester, waschen mit verd. Salzsäure, kalter, verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Trocknen der org. Phase mit Natriumsulfat, filtrieren und entfernen des Lösungsmittels i. V.; 27 g (96%) öliges Ester. Dieses Produkt wurde weiter verarbeitet.

*Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin*⁷⁾ (I): 27 g Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin-äthylester wurden in ein Gemisch von 270 ml Methanol und 102 ml 1-n. NaOH eingetragen und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Methanol i. V. verdampfen, Zugabe von 600 ml Wasser, in Eis stellen, ansäuern mit verd. Salzsäure, ausziehen mit Essigester, neutral waschen, trocknen über Natriumsulfat, filtrieren und verdampfen des Lösungsmittels. Rückstand Öl. Beim Behandeln mit Essigester-Petroläther 24 g (96%) Kristalle, Smp. 100–102°.

Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin-cyanmethylester (II): 6,23 g (0,0193 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin, 5,2 ml (0,037 Mol) Triäthylamin und 4,3 ml (0,067 Mol) Chloracetonitril werden aufgearbeitet wie bei ⁶⁾. Rückstand 6,52 g (93%) öliges Ester.

*Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester*⁸⁾ (III): 6,52 g (0,018 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucin-cyanmethylester, 2,15 g (0,015 Mol) Glycin-äthylester-hydrochlorid, 2,6 ml (0,018 Mol) Triäthylamin, 0,09 ml Eisessig und 10 ml Tetrahydro-furan wurden 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach der üblichen Aufarbeitung und multiplikativer Verteilung im System Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Methanol-Wasser (= 9:1:8:2, v/v), K = 1,96 (22°), kristallisierten aus Essigester-Petroläther 7,0 g (95%) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester, Smp. 105–107°.

*Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin*⁸⁾ (IV): 7,0 g Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester wurden in ein Gemisch von 70 ml Methanol und 23 ml 1-n. NaOH eingetragen und 2 Std. bei Zimmertemperatur belassen. Weitere Aufarbeitung wie bei ⁸⁾ beschrieben. Rückstand Öl. Beim Behandeln mit Essigester-Petroläther 6,1 g (93%) Kristalle, Smp. 109–111°. Eine Probe wurde in Methanol-verd. HCl in üblicher Weise hydriert und nach dem Behandeln mit schwach basischem Ionenaustauscher das Tripeptid aus Wasser-Äthanol kristallisiert; $[\alpha]_D^{20} = -41,83^\circ$ (1% in Wasser).

Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-p-nitrophenylester (V): 500 mg (0,00132 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin, 503 mg (0,00155 Mol) Di-(p-nitrophenyl)-sulfit und 4 ml Pyridin wurden 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Lösung wurde auf 30 ml eiskalte 1-n. Salzsäure gegossen und mit Essigester ausgezogen. Neutralwaschen mit ges. Kochsalzlösung, trocknen über Natriumsulfat, einengen i. V., Rückstand Öl. Beim Behandeln mit abs. Äther Kristalle. Umkrist. aus Aceton-Äther, 373 mg (56%), Smp. 155,5–156,5°.

Glycyl-L-leucyl-glycin-p-nitrophenylester-hydrobromid (VI): 100 mg Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-p-nitrophenylester wurden in 1 ml Eisessig-HBr (ca. 2,24-n.) gelöst und 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Lösungsmittel wurde i. V. verdampft, der Rückstand in Aceton gelöst und in Äther eingetroppt. Über Nacht stehenlassen; das abgeschiedene Öl kristallisierte beim Versetzen mit Äther. Umkristallisieren aus Aceton-Äther; 60 mg (67%), Smp. 112–115°.

¹³⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, Chem. Ber. **65**, 1192 (1932).

Cyclisierung von VI: 447 mg (0,001 Mol) Glycyl-L-leucyl-glycin-p-nitrophenylesterhydrobromid wurden in 7 ml Dimethylformamid gelöst, mit 4 Tropfen Eisessig versetzt und die Lösung während 5 Std. in 85 ml Pyridin (Rühren, 95°) eingetropfelt. Das Pyridin wurde i. V. verdampft, der Rückstand getrocknet (4 Std./70°/10⁻³ Torr). Lösen in 120 ml Methanol-Wasser 1:1 und filtrieren durch je eine Säule sauren und basischen Ionenaustauscher. Nach dem Einengen des Filtrates kristallisierten 46 mg (20,2%) VII. Zur Analyse aus Wasser umkristallisieren, trocknen 4 Std./110°/10⁻²·10⁻³ Torr.

Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-cyanmethylester (VIII): 3,020 g (0,0079 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin, 2,1 ml (0,015 Mol) Triäthylamin und 1,9 ml (0,030 Mol) Chloracetonitril wurden wie üblich⁶⁾ umgesetzt und aufgearbeitet. Rückstand: farbloses, kristallisierendes Öl, welches aus Essigester-Petroläther kristallisierte, 2,930 g (88%), Smp. 80–82°.

Glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester-hydrobromid: 4,1 g Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester wurden in 41 ml Eisessig-HBr (ca. 2,24-n.) gelöst, 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt und das Lösungsmittel i. V. verdampft. Der Rückstand wurde aufgenommen in einem Gemisch von Methanol, Wasser, CCl₄, CHCl₃ (1:1:1:1 v/v). Nach dem Verdampfen der wässrigen Phase verblieben 3,504 g (98,4%) rohes Tripeptidesterhydrobromid.

Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester (IX): 3,786 g (0,0093 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycin-cyanmethylester, 3,504 g (0,0099 Mol) Glycyl-L-leucyl-glycin-äthylester-hydrobromid, 1,8 ml (0,013 Mol) Triäthylamin, 0,04 ml Eisessig und 28 ml Tetrahydro-furan wurden 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Aufarbeitung wie üblich, Rückstand farbloses Öl. Umfällen aus MeOH-Äther: 4,5 g (79,1%) feste Verbindung, Smp. 176–188°. Reinigung durch multiplikative Verteilung im System CCl₄/CHCl₃/MeOH/Wasser (7:3:7:3 v/v). K aus $r_{\max} = 1,243$ (22°), Smp. 186–188°.

Cbo·(Gly-L-Leu-Gly)₂·OH (X): 1,3 g (0,0022 Mol) Cbo·(Gly-L-Leu-Gly)₂·OC₂H₅ wurden in ein Gemisch von 13 ml MeOH und 2,3 ml 1-n. NaOH eingetragen und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. MeOH i. V. verdampfen. Zugabe von 40 ml Wasser, in Eis stellen, ansäuern mit verd. Salzsäure, ausziehen mit Essigester, neutral waschen, trocknen über Natriumsulfat, filtrieren und verdampfen des Lösungsmittels. Rückstand Öl, umkristallisieren aus MeOH-Äther, Smp. 155–158°, 843 mg (65,7%).

Carbobenzoxy-glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycyl-p-nitrophenylester (XI): 843 mg (0,0014 Mol) Cbo·(Gly-L-Leu-Gly)₂·OH und 608 mg (0,00183 Mol) Di-(p-nitrophenyl)-sulfid wurden in 4 ml Pyridin gelöst und 18 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Lösung wurde auf 30 ml eiskalte 1-n. Salzsäure gegossen und mit Essigester ausgezogen. Neutralwaschen mit ges. Kochsalzlösung. Trocknen über Natriumsulfat, einengen i. V. Rückstand Öl, verreiben mit Äther-Petroläther (1:1), dadurch wurde das freie p-Nitrophenol entfernt. Rückstand 750 mg (74,2%) farblose, feste Substanz. Die Reinheit des p-Nitrophenylesters wurde wie folgt bestimmt: 7,27 mg Ester (entsprechend 10⁻⁵ Mol bei 100% Reinheit) wurden in 5 ml MeOH gelöst und mit 1-n. NaOH auf 10,0 ml aufgefüllt. Nach dem Verdünnen mit Methanol (50×) wurde die Extinktion bei 400 mμ im BECKMAN-Spektrophotometer (Mod. DU) gemessen und mit einer Eichkurve verglichen, welche mittels p-Nitrophenol im gleichen Lösungsmittel bestimmt worden war (bei einer Molarität von 5×10⁻⁶ bzw. 1,0, 5,0 und 6,0×10⁻⁵ wurden Extinktionen von 10600, 14200, 20160 und 21900 gefunden). Die gemessene Extinktion (18700) entsprach 4,1×10⁻⁵-m., Reinheit des p-Nitrophenylesters also 82%.

HBr, H·(Gly-L-Leu-Gly)₂·OC₆H₄NO₂(p) (XII): 740 mg Cbo·(Gly-L-Leu-Gly)₂·OC₆H₄NO₂(p) wurden in 7,5 ml Eisessig-HBr (ca. 2,24-n.) gelöst und 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Lösungsmittel wurde i. V. verdampft und der Rückstand mit einem Gemisch von Methanol-Wasser, CCl₄, CHCl₃ (1:1:1:1) behandelt; nach dem Verdampfen der wässrigen Phase verblieben 526 mg (77%) XII in Form einer fast farblosen Substanz, die nicht weiter gereinigt wurde.

Cyclisierung von XII: 514 mg (0,00076 Mol) XII wurden in 7 ml Dimethylformamid gelöst, mit 4 Tropfen Eisessig versetzt und die Lösung während 5 Std. in 85 ml Pyridin (Rühren, 95°) eingetroppt. Das Pyridin wurde i. V. verdampft und der Rückstand getrocknet (4 Std./70°/10⁻³ Torr). Lösen in 120 ml Methanol-Wasser (1:1) und filtrieren durch je eine Säule stark sauren und basischen Ionenaustauscher. Nach dem Einengen des Filtrates verblieben 197 mg (Rohausbeute 57%) farblose Substanz. Umkrist. aus Wasser, Trocknen 4 Std./110°/10⁻³ Torr, Smp. (304° braun) 310–312° (Zers.). Berücksichtigt man die etwa 80-proz. Reinheit des p-Nitrophenylesters, so ergibt sich eine Rohausbeute von 67,9%. $[\alpha]_D^{25} = -44,4^\circ \pm 4^\circ$ (0,312% in Eisessig); Molekulargewicht (in Dimethylsulfoxyd): Ber. 454, Gef. 445. Verhältnis Gly: Leu Ber. 2:1, Gef. 2:1 (Bestimmung nach FISCHER & DÖRFEL¹⁴)).

Die Mikroanalysen und IR.-Spektren wurden am Chemischen Institut der Universität Zürich von Herrn H. FROHOFER ausgeführt bzw. aufgenommen. Die RÖNTGEN-Diagramme wurden von Herrn PD. Dr. H. LABHARDT, Physiklaboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, aufgenommen.

SUMMARY

Cyclization of the p-nitrophenyl esters of glycyl-L-leucyl-glycine, and of glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycine yields the same crystalline cyclohexapeptide. The intermediates were synthesized *via* cyanomethyl esters.

Chemisches Institut der Universität Zürich

¹⁴) F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953); die Bestimmung wurde von Herrn K. ZATSKÓ ausgeführt.

233. Etude polarographique de la cyclohexanedione-dioxime (nioxime)

par D. Monnier et W. Haerdi

(25 IX 58)

Lors d'une étude analytique de la cyclohexanedione-dioxime (nioxime), que nous représenterons par l'expression $(RH_2)^1$, nous avons déterminé les constantes acide-base de ce réactif par pH-métrie, ainsi que le produit de solubilité de la nickel-nioxime. De plus, le comportement polarographique de la nioxime avait été examiné. Dans ce dernier cas, nous avons observé des anomalies. En effet, la nioxime donne trois vagues, V_I , V_{II} , et V_{III} . La première n'apparaît qu'en milieu acide, à des pH inférieurs à 5. V_{II} s'observe entre les pH 2 et 10, et V_{III} , dès le pH 4 ou 5. Quand on construit les courbes correspondant aux hauteurs des vagues en fonction du pH (fig. 1), on constate qu'à 20° V_{II} et V_{III} se coupent au pH de 7,7 environ. Cette valeur est une véritable constante, elle a été trouvée par d'autres auteurs²). On pouvait supposer que les vagues V_I , V_{II} et V_{III} avaient pour origine les particules RH_2 , RH^- et R^{--} , et dans ces conditions le pH de croisement des courbes devait permettre de calculer les

¹) P. E. WENGER, D. MONNIER & W. BACHMANN, *Analyt. chim. Acta*, **15**, 473 (1956).

²) C. CALZOLARI & C. FURLANI, *Annali triestini* **22**, 2 (1953).