

- [4] H. Bode & F. Neumann, Z. analyt. Chem. 172, 1 (1960).
[5] H. Förster, J. Radioanal. Chem. 4, 1 (1970).
[6] A. Hulanicki, Talanta 14, 1371 (1967).
[7] F. Kukula & M. Simkova, J. Radioanal. Chem. 4, 271 (1970).
[8] W. Kemula, A. Hulanicki & W. Nawrot, Roczniki Chem. 36, 1717 (1962); 38, 1065 (1964) (taken from ref. 6).
[9] V. Tamminen & E. Hjeld, Suomen Kemi, 23 B, 39 (1950).
[10] E. A. Haktila & G. R. Waterburg, Anal. Chem. 32, 1340 (1960).
[11] G. Schwarzenbach, 'Complexometric Titrations', Interscience, New York 1957.
[12] A. Ringbom, 'Complexation in Analytical Chemistry', Interscience, New York-London 1963.
[13] Y. Marcus, Acta chem. scand. 11, 599 (1957).
[14] G. B. Briscoe & S. Humphries, Talanta 16, 1403 (1969).

121. Zur Problematik der Peptidsynthese an Trägern: Beitrag eines neuen Verfahrens mit löslichen Trägern

von R. H. Andreatta und H. Rink

Zentrale Forschung der CIBA-GEIGY A.G., Basel

(26. I. 73)

Summary. A new procedure for the synthesis of peptides on a soluble carrier is described. It relies on gel filtration for the removal of low molecular weight reactants from the peptide-polymer complex after each cycle. The advantages of the method are assessed and the insight into the problematics of the carrier synthesis which it provides are discussed. Finally, the use of a monovalent, soluble carrier molecule of defined chemistry is proposed. Such a carrier should reduce the problems of carrier synthesis to the purely chemical ones commonly associated with peptide synthesis.

1. Einleitung. – Der Darstellung von Peptiden in reiner Form mittels der Festphasenmethode nach Merrifield [1]–[4] sind enge Grenzen gesetzt. Diese werden gesteckt durch:

a) Chemische Gegebenheiten wie Nebenreaktionen, unvollständig ablaufende Umsetzungen und Racemisierungen.

b) Physikalische Gegebenheiten wie beschränkte Diffusion der Reaktionskomponenten in die feste Matrix, limitierte Zugänglichkeit gewisser an der festen Phase verankerten Aminosäuren oder Peptide aus sterischen oder Solvatationsgründen.

Einschränkend für die Methode und deren Ausbau zu einem tauglichen Instrument der Peptidsynthese ist auch der Umstand, dass chemisch-analytische Bestimmungen (Umsatzkontrolle durch Restgruppenbestimmung) als Wegbereiter für Verbesserungen unbefriedigend sind, da sie mit den gleichen Unsicherheitsfaktoren behaftet sind, wie die Reaktion, die es zu untersuchen gilt. Die Strategie des stufenweisen Aufbaus, wie er in der Festphasenmethode ausschliesslich verwendet wird, bringt es mit sich, dass entstehende Fehlsequenzen mit dem gewünschten Produkt strukturell eng verwandt sind und deshalb die Abtrennung von Fehlsequenzen schon bei relativ kurzkettingen Peptiden schwierig wird. Die generelle Problematik der Peptidsynthese einschliesslich jener am Träger hat kürzlich Wünsch [5] in einer Übersicht kritisch beleuchtet.

Die ersten Versuche, durch physikalische Gegebenheiten gesteckte Grenzen zu beseitigen, gehen auf *Shemyakin et al.* [6] zurück. Die Autoren ersetzten den festen, mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrol-Träger der *Merrifield*-Technik [1] durch einen linearen, hochmolekularen Träger, der ihnen gestattete, sämtliche Umsetzungen in Lösung auszuführen und damit allfällige beschränkende Faktoren der Diffusion auszuschalten. Die niedermolekularen Reaktionskomponenten wurden durch Ausfällen der Polymeren abgetrennt, eine Operation, die nicht quantitativ verläuft und den Niederschlag oft in ungeeigneter physikalischer Form liefert. Diesen Nachteil konnte auch ein neues, von *Green & Garson* [7] beschriebenes Umfäll-Verfahren nicht beseitigen. Diese Trägersynthese in flüssiger Phase ist denn nur sehr vereinzelt und lediglich zur Darstellung kurzer Peptide angewandt worden (vgl. [6–9]).

In neuester Zeit beschrieben *Bayer et al.* [10] eine Methode, die mit löslichem Polyäthylenglykol als Träger arbeitet, sich aber zur Abtrennung der niedermolekularen Reagentien der Ultrafiltration bedient.

In dieser Mitteilung beschreiben wir ein Verfahren zur Synthese von Peptiden an löslichmachenden Trägern, das die Diffusionsprobleme der Festphasenmethode beseitigt. Es gestattet die Abtrennung der Reagentien von der an die Trägermolekel gebundenen, wachsenden Peptidkette auf einfache, schnelle und zuverlässige Art. Anhand einer Anzahl chemischer und kinetischer Befunde wird die grundlegende Problematik der Polymerträgersynthese dargestellt. Insbesondere wird gezeigt, dass es neben chemischen Faktoren, sterische Einschränkungen sind, welche die Grenzen der Festphasenmethode so eng gestalten und dass diese durch den Ersatz der festen durch die lösliche Phase nur unwesentlich aufgeweitet werden.

Schliesslich wird ein möglicher Weg postuliert, der den attraktiven Wesenszügen der Trägersynthese Rechnung trägt und deren Probleme auf die Chemie der klassischen Peptidsynthese reduzieren sollte.

2. Untersuchungen an löslichen Trägern. – a) *Träger und Trennprinzip.* Als carboxylterminale, makromolekulare Schutzgruppe und zugleich als Löslichkeitsvermittelnder Träger diente in unseren Versuchen lineares, monodisperses Polystyrol (Mol.-Gew. 20400) (I)¹).

Dieses lässt sich glatt durch Gelfiltration an *Bio-Beads* S-X1 von niedermolekularen Komponenten trennen. Gleiches gilt für sein Chlormethylderivat II und seine mit geschützten Aminosäuren und Peptiden esterartig verknüpften Abkömmlinge. Als Lösungsmittel bei der Auftrennung diente durchwegs Methylenchlorid. Die ebenfalls in Erwägung gezogenen Gele mit höherer Quervernetzung (*Bio-Beads* S-X3 und S-X8), entsprechend geringerer Quellung und niederer Ausschlussgrenze, zeigten eine stark reduzierte Kapazität, das Testgemisch $\text{PS}_L/\text{Boc-Phe-OH}$ 5:1 in die Komponenten aufzutrennen. Dagegen erwies sich das erst kürzlich im Handel erhältliche poröse Glas CPG-10 (Porendurchmesser 75 Å) in der hydrophobisierten Form hinsichtlich der Trennkapazität dem *Bio-Beads* S-X1 als ungefähr ebenbürtig. Quellungsgrad und Trennkapazität von *Bio-Beads* S-X1 verringern sich drastisch beim Übergang von reinem Methylenchlorid zu stärker polaren Lösungsmitteln oder Gemischen. Wenn die Löslichkeitseigenschaften des Peptid-Polymeresters den Übergang auf

¹) Im folgenden als PS_L bezeichnet; zu der in dieser Arbeit verwendeten abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [11]; ferner bedeuten: Boc: *t*-Butyloxycarbonyl; Z: Benzylloxycarbonyl; Bzl: Benzyl; NP: *p*-Nitrophenyl; DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid; DCH: Dicyclohexylharnstoff; Triton B: Benzyltrimethylammoniumhydroxyd; T⁺: Benzyltrimethylammoniumion.

polarere Systeme notwendig machen, dürfte sich das poröse Glas als Trennsystem besser eignen. Nichthydrophobisiertes Glas hält grössere Mengen polarer, auch nicht ionischer Komponenten zurück und wurde deshalb für unsere Zwecke mittels Dimethyldichlorsilan hydrophobisiert [12].

Ein typisches Beispiel einer Auftrennung an *Bio-Beads S-X1* von hochmolekularem Peptid-Träger und niedermolekularen Reaktionskomponenten gibt Fig. 1 wieder.

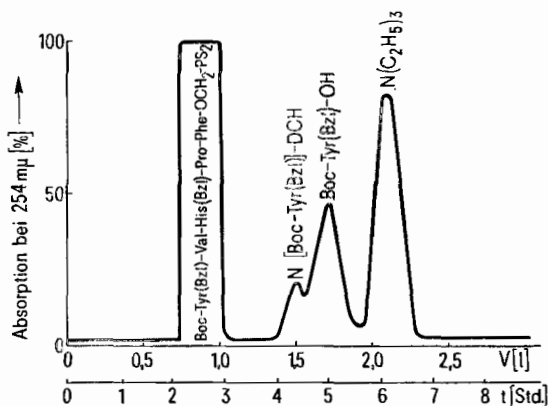


Fig. 1. Gelchromatographie an *Bio-Beads S-X1*. Kolonnendimensionen: 4 × 200 cm. Aufgetragen: 1,7 g Reaktionsgemisch in 5 ml Methylenchlorid. Erhalten: 1,3 g Polymer (Peptidbeladung: 0,45 mmol/g). Durchflussgeschwindigkeit: 335 ml/Std.

b) *Verankerung der ersten Aminosäure.* Zur Verankerung der ersten Aminosäure an der von uns gewählten Trägermolekel bedienen wir uns etablierter Verfahren. Die Chlormethylierung des monodispersen Polystyrols erfolgte durch Chlormethyläther mit Zinkchlorid als Katalysator [8]. Wie Fig. 2 zeigt, lässt sich die Zahl

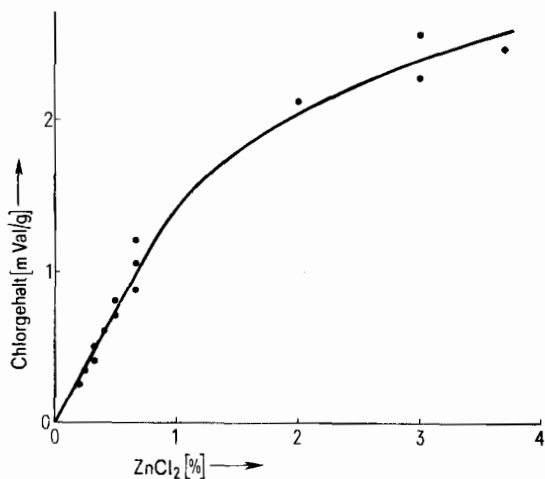


Fig. 2. Chlormethylierung von monodispersem Polystyrol. Abhängigkeit des Chlormethylierungsgrades von der Katalysatormenge. Bedingungen: 20°, 15 Std., Polystyrolkonzentration 15%.

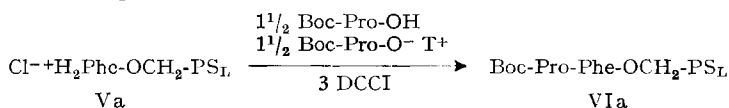
der eingeführten Chlormethylgruppen innerhalb gewisser Grenzen durch die Katalysatormenge steuern.

Die Umsetzung des chlormethylierten Trägers mit der zu verankernden, N-geschützten Aminosäure erfolgte nach *Loffet* [13]. Die Darstellung von Estern des Typs III (vgl. Fig. 3) verlief in keinem Falle quantitativ. Je nach Art der zu verknüpfenden Aminosäure verblieben im polymeren Endprodukt 10–30% Chlormethylgruppen. Die auf Grund des Restchlorwertes berechnete Aminosäurebeladung stimmte aber in jedem Falle mit den unabhängig durch Aminosäuregehaltsbestimmung [14] und Stickstoffanalyse gefundenen Werten überein. Die Produkte waren praktisch frei von ionisch (über quaternäre Ammoniumionen am Träger) gebundenen Aminosäuren: im Umsetzungsprodukt IIIa aus Chlormethylpolystyrol und Boc-Phe-OH konnte dünnschichtenchromatographisch kein freies Boc-Phe-OH nachgewiesen werden. Gelfiltration von IIIa in Gegenwart überschüssiger *p*-Toluolsulfonsäure lieferte in der Polymerfraktion ein Produkt, dessen Schwefelgehalt unter der elementaranalytisch erfassbaren Grenze von 0,1% lag. Ein analoger Versuch mit Dichloressigsäure ergab ein Polymerprodukt unveränderten Chlorgehaltes. Die mannigfachen Komplikationen, die von ionisch gebundenen Aminosäuren herrühren [13], waren damit ausgeschaltet.

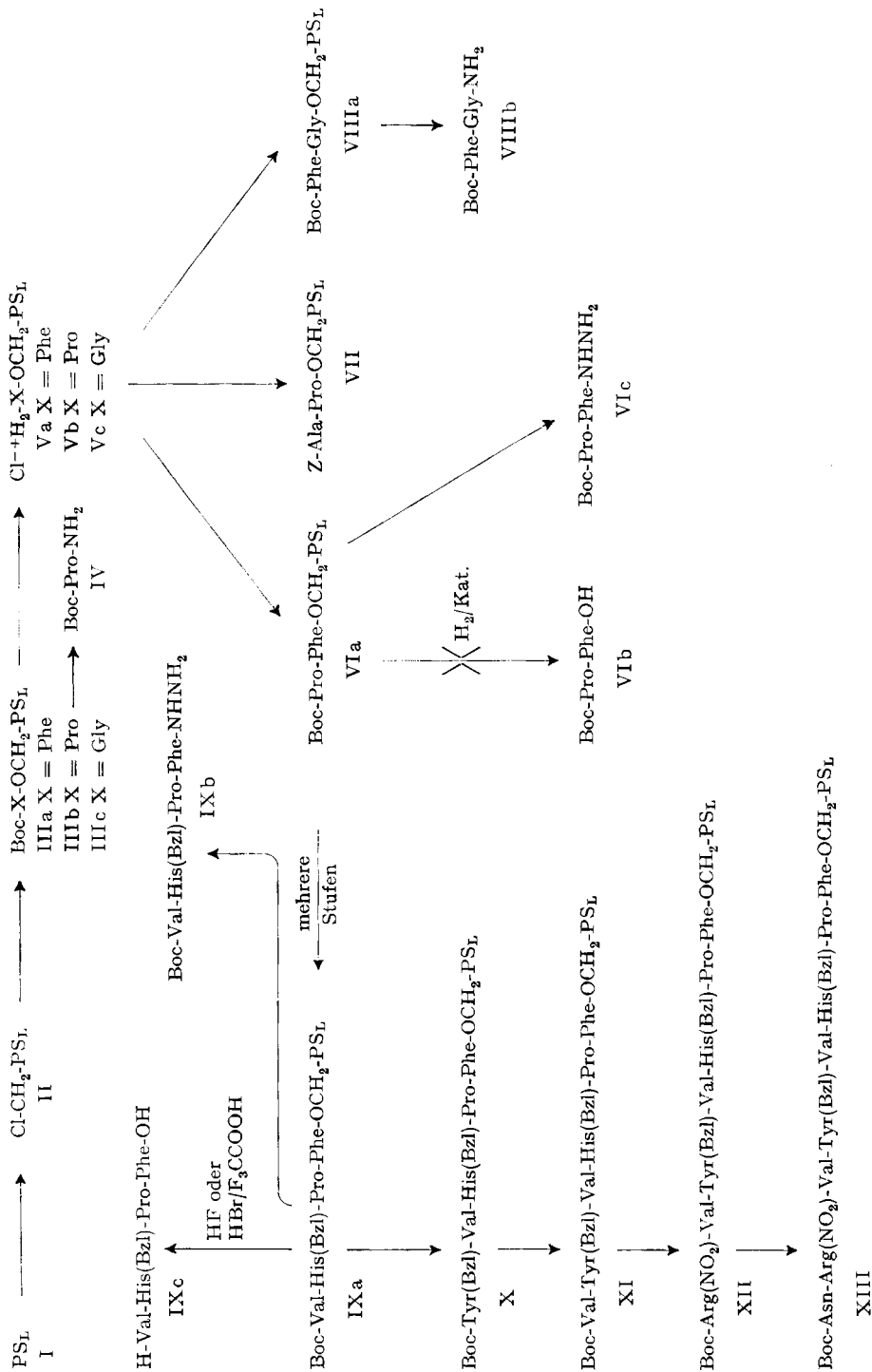
c) *Entfernung der Schutzgruppe und Kupplung.* Die wichtigsten im Verlauf unserer Arbeiten durchgeführten Umsetzungen zeigt das Schema auf Seite 1209.

Die Aminschutzgruppe (Boc) entfernte man mittels 4N HCl in Dioxan. Lediglich im Falle des Boc-Phe-OCH₂-PS_L (IIIa) erwies sich die 30min. Einwirkung dieses Reagens als ungenügend. Für die vollständige Entfernung der Boc-Gruppe war eine 2stdg. Behandlung mit 5N HCl in Dioxan notwendig. Die übliche Deblockierung führte nämlich, und zwar nur in diesem speziellen Falle, nach Umsetzung mit Boc-Pro-OH/DCCI zu einem Gemisch von Boc-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (V) und Boc-Phe-OCH₂-PS_L (IIIa). Dies ergab sich aus der Hydrazinolyse des Kupplungsproduktes, welche neben Boc-Pro-Phe-NHNH₂ auch Boc-Phe-NHNH₂ lieferte. Auf ähnliche Schwierigkeiten bei der Abspaltung der Boc-Gruppe von Boc-Phe-OCH₂-PS_L (Mol.-Gew. 200000) haben bereits *Ovchinnikov et al.* [9] und bei der Festphasenmethode *Shapira et al.* [15] hingewiesen. Mit der Hydrazinolyse von Peptid-Polymerestern in Lösung, die, wie weiter unten gezeigt werden wird, mit hoher Ausbeute verläuft, ist eine empfindliche analytische Methode gefunden worden. Sie erlaubt es, in dem von uns gewählten System den Umsatz bei der Deblockierung mittels Dünnschichtchromatographie halbquantitativ zu verfolgen und schafft eine Grundlage für die Optimierung der Bedingungen. Sie bietet, im Gegensatz zur Festphasenmethode, wo derartige Ablösereaktionen schlechter verlaufen [16], die Möglichkeit zur qualitativen und quantitativen Einsicht in die Vorgänge am Träger.

Nach Entfernung der Schutzgruppe wurde das anfallende Hydrochlorid, das meist nur geringe Löslichkeit in Methylenchlorid aufwies und deshalb nicht gefiltriert wurde, direkt mit der nächsten Boc-Aminosäure umgesetzt. Das folgende Schema gibt ein Beispiel.



Schema



Die Carboxylkomponente wurde zur Hälfte in der Form ihres Tritoniumsalzes eingesetzt. Die Gründe für diese Art der Umsetzung sind zweifach:

1. Bei der Festphasensynthese wird nach der Neutralisation des Hydrochlorides und allfällig nicht ionisch gebundener Salzsäure mittels überschüssigen Triäthylamins das Harz ausgewaschen, und es liegen somit, im Idealfall, alle Aminkomponenten in freier, acylierbarer Form vor. Im Falle der löslichen Träger ist eine dosierte Neutralisation mittels Triäthylamin ohne Reinigung auf der freien Aminstufe nicht möglich. Von einer solchen wurde abgesehen, weil sie die Möglichkeit der Autoaminolyse der über längere Zeit (Gelfiltration) freien Aminoester einschliesst, welche wiederum mit der Ausbildung von Hydroxymethylgruppen als Ausgangspunkt von Fehlsequenzen verbunden ist [17]–[19].

2. Die Zugabe überschüssigen Triäthylamins, wie es die Gegenwart nicht ionisch gebundener Salzsäure unbekannter Menge im Träger-Peptid-Verband nötig macht, führt andererseits zu basischen Kupplungsbedingungen, unter welchen die Ausbildung von Acylharnstoffen stark gefördert wird [20]. So ergab ein dreifacher Überschuss von Boc-Val-OH und DCCI bei der Kupplung an $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{Phe-OCH}_2\text{-PS}_L$ (Va) mit Triäthylamin nur unvollständige Kupplung. Die Hauptmenge der eingesetzten Boc-Aminosäure lag nach 5 Stunden als Acylharnstoffderivat vor. Demgegenüber erfolgte die nämliche Kupplung mittels Boc-Val-OH/Boc-Val-O-T⁺ (je 1,5 mol pro mol Aminkomponente) und 3 Äquivalenten DCCI problemlos. Dem Tritoniumsalz fällt die Aufgabe zu, das Hydrochlorid zu neutralisieren, ohne noch vorhandene Chlormethylgruppen in quaternäre Ammoniumionen überzuführen. Je nach Menge der darüber hinaus nicht ionisch gebundenen Salzsäure im Polymeren werden dann 1 bis 1,5 Äquivalente Acylkomponente freigesetzt. Diese liegt also in 2,5- bis 3fachem Überschuss vor. Ein 1,5facher Überschuss an Tritoniumsalz erwies sich durchwegs als hinreichend. Ein Bild über die Vollständigkeit der Acylierung sowie der vorgehenden Deblockierung vermittelten der *Kaiser*-Test [21] bzw. der oben erwähnte Hydrazinolysetest.

Der zeitliche Aufwand für Deblockierung, Kupplung und Auftrennung des Reaktionsgemisches mittels Gelfiltration beträgt ca. 8 Stunden.

d) *Ablösung der Peptide vom Träger.* Die Freisetzung der solcherart aufgebauten Peptide vom Träger wurde am Beispiel des Boc-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (IXa) studiert. Einstündige Behandlung von IXa mit HF bei 0° lieferte das am Imidazolkern geschützte C-terminale Angiotensintetrapeptid IXc in 90proz. Ausbeute bezogen auf IXa. Der Reststickstoffgehalt des isolierten Polymeren betrug ca. 5% desjenigen von IXa.

Mit praktisch gleich hoher Ausbeute erfolgte die Peptidfreisetzung mittels HBr in F₃CCOOH.

Im Zusammenhang mit veröffentlichten Beobachtungen [22] [23], wonach der Einsatz von F₃CCOOH zur Schutzgruppenentfernung in der Festphasenmethode immer auch mit der Freisetzung beträchtlicher Mengen benzylesterartig am Träger verankerter Peptide verbunden ist, interessierte uns die Verwendung von F₃CCOOH als potentiellles Spaltreagens. Aus IXa konnten jedoch im Verlaufe von 24 Stunden bei Raumtemperatur nur 20% des Tetrapeptides IXc freigesetzt werden.

Die Hydrazinolyse von IX a in Dimethylformamid verlief ebenso wie die acidolytischen Spaltungen mit HF und HBr/F₃CCOOH fast quantitativ. Das Hydrazid IX b fiel in praktisch reiner Form an.

Ähnlich verlief die ammonolytische Spaltung, die am Beispiel des Boc-Phe-Gly-OCH₂-PS_L (VIIIa) studiert wurde. Vorerst gab das mit Dioxan/Methanol/NH₃ in Lösung bei 0° behandelte Edukt allerdings ein Gemisch von Boc-Phe-Gly-NH₂ (VIIIb) und Boc-Phe-Gly-OCH₃, welches sich nach Abtrennung des Polymeren und neuerlicher Behandlung mit NH₃ jedoch vollständig ins VIII b überführen liess.

Das durch Ammonolyse im allgemeinen schwer abspaltbare Prolin konnte von Boc-Pro-OCH₂-PS_L (III b) bei ähnlichen Bedingungen, wie *Parr et al.* [24] sie beschrieben (NH₃/Dimethylformamid im Druckgefäss bei 25–35°), nach 100 Stunden kaum zur Hälfte als stark verunreinigtes Boc-Pro-NH₂ freigesetzt werden. Das isolierte Polymere enthielt noch 57% des ursprünglich gebundenen Prolins.

Die oben beschriebenen Freisetzungen verliefen, mit Ausnahme der letzten, mit hoher Ausbeute. Sie stellen so einen potentiell grossen Vorteil der Flüssigphasen gegenüber der Festphasenmethode dar.

Dagegen gelang es nicht, auch nach Variieren des Katalysators und des Lösungsmittels, das aufgebaute Peptid mehr als in geringer Menge (10%) hydrogenolytisch von der Benzylesterverankerung zu lösen. Die durchwegs enttäuschenden Resultate der Hydrogenolyseversuche können durch sterische Faktoren erklärt werden. Hydrogenolyse dürfte nur an den am stärksten exponierten Haftstellen stattgefunden haben. Dafür spricht der Befund, dass eine weitere hydrogenolytische Behandlung kein Peptid mehr freisetzte.

e) *Grenzen der Beladung.* Schliesslich gaben unsere Arbeiten eine Antwort auf die Frage, welchem Anteil Peptid das von uns gewählte Polystyrol Löslichkeit in Methylenchlorid zu verleihen vermag. Die Antwort hängt natürlich von verschiedenen Faktoren ab, sicher von der Art der Aminosäuren, deren Sequenz und dem Charakter der Schutzgruppen. Unsere Versuche ergaben, dass Boc-Phe-OCH₂-PS_L (IIIa) mit einer Beladung von 0,5 mmol Phe/g ohne Probleme bis zum Boc-Val-Tyr(Bzl)-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (XI) aufgebaut werden kann. Mit der Einführung des Boc-Arg(NO₂) auf dem Wege zum geschützten Angiotensinamidester (XIII) fällt die Löslichkeit des Produktes in Methylenchlorid derart stark, dass Gelfiltration und Kupplungsreaktion im üblichen System nicht mehr durchführbar sind. Die vollständige Synthese von Angiotensinamid nach unserem Verfahren würde also die Wahl eines geringer beladenen Trägers erfordern. Auf die Fortführung der Synthese, z. B. nach dem *Ovchinnikov*'schen Verfahren (Umfällung), wurde indessen verzichtet.

f) *Kinetische Versuche.* *Maher et al.* [25] zeigten mit ihren kinetischen Arbeiten, dass die trägerfreie Aktiv-Ester-Kupplung (Z-Leu-ONP/H-Gly-OEt) ca. 100mal schneller verläuft als die am quervernetzten Träger (2% Divinylbenzol). Bei Verwendung eines festen, linearen Polystyrolträgers reduziert sich dieser Faktor auf ca. 3.

A. Losse [26] kam auf Grund von Diffusionsstudien an quervernetzten Polystyrolen zum Schluss, dass im *Merrifield*-Harz die Diffusion der Reagentien ohne wesentlichen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit ist. Danach soll diese in erster Linie durch sterische Faktoren am Reaktionszentrum begrenzt sein.

Um die Reaktionsgeschwindigkeit in unserem System mit denjenigen im trägerfreien und im *Merrifield*-Verfahren zu vergleichen, wurde die Kinetik der Aminolyse eines aktiven Esters in allen drei Systemen untersucht (vgl. Fig. 3).

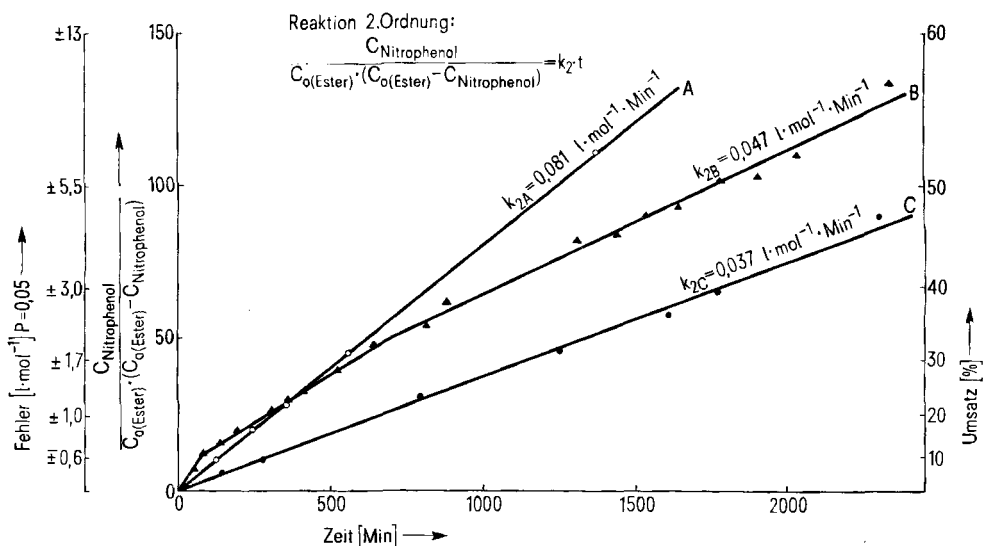


Fig. 3. Kinetik der Aminolyse von *Z*-Ala-ONP mit *H*-Pro-OCH₂-R

A: R = -C₆H₅

B: R = -polystyrol, linear, Mol.-Gew. 20400, löslich

C: R = -polystyrol, mit 2% Divinylbenzol vernetzt, Festphase

Reaktionsbedingungen: Chloroform, 24°

Startkonzentrationen: C_{0(Ester)} = C_{0(Amin)} = 10⁻² mol · l⁻¹

Die Reaktionssysteme A und C zeigen eine Kinetik 2. Ordnung. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von A und C ist ca. 2. Dieser Befund steht in krassem Gegensatz zu den Resultaten von *Maher et al.* [25].

Die mittlere Umsatzgeschwindigkeit im System B liegt erwartungsgemäss zwischen den Werten für A und C. Bemerkenswert ist, dass die Kinetik B in der Initialphase nicht linear ist. Auch verläuft die Reaktion anfänglich signifikant schneller als bei A.

3. Diskussion der Resultate. – Auf die chemischen und methodischen Vorteile des vorgestellten Verfahrens ist hingewiesen worden. Weniger offenbar ist seine mögliche Bedeutung für eine Einsichtnahme in die sterischen Verhältnisse, welche die Chemie an Trägern bestimmen. So resultiert aus unseren chemischen und kinetischen Daten, dass sich der von uns gewählte polyvalente Träger hinsichtlich seinem chemischen Verhalten eindeutig heterogen verhält: Hydrogenolytisch spaltbaren Benzylesterfunktionen stehen resistente Verankerungen gegenüber; die Umsetzung am Träger verläuft kinetisch nicht linear (vgl. System B). Sterische Gründe können dieses Verhalten erklären. Ein geringer Anteil der Reaktionszentren weist eine, verglichen selbst mit der trägerfreien Umsetzung, signifikant erhöhte Reaktionsfähigkeit auf (vgl. Initialphase der Kinetik von B mit derjenigen von A). Offenbar handelt es

sich hier um eine sich positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkende Mitwirkung des Trägers, ein Phänomen, das im Festphasensystem nicht beobachtet wird.

Die Kinetik der Umsetzung am festen Träger (C) zeigt innerhalb des Messbereiches Linearität. Im System C verhält sich mindestens die Hälfte der Verankerungen chemisch äquivalent, im System B ein geringerer Teil. In beiden Systemen lässt unsere Versuchsanordnung keine Schlüsse über den besonders interessierenden kinetischen Verlauf der Endphase der Reaktion zu (Messfehler vgl. Fig. 3). *Rudinger et al.* [27] beobachteten an der festen Phase (unserem System C entsprechend) praktisch unveränderte Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bis zu einem Umsatz von 50%, danach ein starker Abfall derselben. Damit wiesen sie auf das Vorhandensein verschiedener reaktiver Zentren am festen Trägerharz hin.

Die Ausschaltung der Diffusion durch den Übergang vom unlöslichen auf den löslichen Träger bringt bezüglich Umsatzgeschwindigkeit in der kinetisch erfassten Umsatzphase keine bedeutenden Vorteile (vgl. K_{2B} und K_{2C}).

In Übereinstimmung mit *A. Losse* [26] und *G. Losse et al.* [28] finden wir, dass die Diffusion der Reaktionskomponenten in die feste Phase kein limitierender Faktor von Bedeutung ist. Ein polyvalentes Trägersystem wie das unsere, mit endständigen, penultimoständigen und weiter im Innern der kettenförmigen Molekel befindlichen Verankerungen verhält sich wie das Festphasensystem chemisch nicht homogen.

Die logische Konsequenz dieses letzteren Befundes wäre die Einführung eines chemisch einheitlichen, monovalenten Trägers. Ein solcher würde einerseits die Vorzüge der Trägersynthese bewahren und andererseits die Optimierung der Umsetzung am Träger durch Schaffung klarer kinetischer und analytischer Verhältnisse gestatten. Die grossen Überschüsse an Reagentien, die bis jetzt in der Trägersynthese nötig sind, könnten reduziert und damit die Ausbildung von Nebenprodukten, z. B. Diacylverbindungen [29] vermindert werden. Des weiteren würde die quantitative Ablösung vom Träger, besonders auch die Hydrogenolyse, in den Bereich der Möglichkeiten rücken. Die Problematik der Trägersynthese wäre dann auf das rein Chemische der klassischen Peptidsynthese reduziert. Entsprechende Versuche sind im Gange.

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatographien wurden an selbst hergestellten Platten (Schichtdicke 0,25 mm; aktiviert bei 110°) ausgeführt. Als Trägermaterialien dienten A: Kieselgel G (*Merck*) und B: Kieselgel G-HR/UV 254 (*Machery, Nagel & Co.*).

Die als Fliessmittel verwendeten Lösungsmittelsysteme hatten folgende Zusammensetzung (in Volumenteilen):

- (1) = Benzol/Aceton 7:3,
- (2) = Acetonitril/Wasser 3:1,
- (3) = Methyläthylketon/Pyridin/Wasser 195:15:60,
- (4) = Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5.

Der Nachweis der Substanzen auf den Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens, mit Ninhydrin und durch UV.-Licht.

a) Gelfiltration.

Bereitung der Kolonne von Bio-Beads S-X1. 350 g *Bio-Beads S-X1*²⁾ (200–400 Mesh) wurden im Scheidetrichter mit 3 l Methylenchlorid kräftig geschüttelt. Nach 3 Min. Trenndauer wurden die unteren, leicht getrübbten 1,5 l Lösungsmittel abgetrennt, durch frisches Methylenchlorid ersetzt und der Waschprozess 4mal wiederholt. Insgesamt wurden auf diese Weise total ca. 5 g der

²⁾ Kommerziell erhältlich bei *Bio-Rad Laboratories*, Richmond, Cal. 94804, U.S.A.

feinsten, in Methylenchlorid am langsamsten aufsteigenden *Bio-Beads*-Partikel abgetrennt. Die Suspension wurde in eine am untern Ende mit Watte und wenig Seesand versehene Kolonne (4×200 cm) eingefüllt, deren Auslauf mit einem *Uvicord* (Durchflussküvette mit UV.-Absorptionsmeter und Schreiber) verbunden war. Die Kolonne wurde mit Methylenchlorid gewaschen, bis die Absorption bei 254 nm, Durchflusgeschwindigkeit und Kolonnenhöhe konstante Werte (0, bzw. 330 ml/h, bzw. 200 cm) erreicht hatten.

Trennung des Testgemisches $PS_L/Boc-Phe-OH$ an Bio-Beads S-X1. Eine Lösung von 1,0 g monodispersen Polystyrol³⁾ und 0,2 g *Boc-Phe-OH* in 5 ml Methylenchlorid wurde auf die oben beschriebene Kolonne gegeben. Bei konstanter Durchflusgeschwindigkeit von 330 ml/Std. eluierte Methylenchlorid vorerst quantitativ das Polystyrol, dessen Elution bei $V = 710$ ml (2,15 Std.) einsetzte und bei $V = 960$ ml (2,9 Std.) beendet war. Die niedermolekulare Komponente des angewandten Gemisches, *Boc-Phe-OH*, wurde gleichfalls quantitativ, zwischen $V = 1680$ ml und $V = 1860$ ml (5,1–5,6 Std. nach Auftragen) eluiert. Der Schreiber des *Uvicord* registrierte zwei symmetrische Signale. 6 Std. nach Auftragen des zu trennenden Gemisches stand also die Kolonne für eine weitere Trennung bereit. Die Kolonne wurde im Verlaufe von 6 Monaten für über 50 Trennungen eingesetzt, wobei bis zu 3,0 g der in dieser Arbeit auftretenden Gemische problemlos in einem Arbeitsgang getrennt wurden. Im Verlaufe dieser Zeitspanne sank die Durchflusgeschwindigkeit nur unwesentlich auf 310 ml/Std. Für grössere Ansätze (bis 6 g Gemisch) bediente man sich wiederholt einer Kolonne der Dimensionen 5×230 cm (Durchflusgeschwindigkeit 430 ml/Std.; 600 g *Bio-Beads* S-X1 enthaltend; V_0 für PS_L 1400 ml). Für eine derartige Trennung vgl. Fig. 1.

Trennung des Testgemisches $PS_L/Boc-Phe-OH$ an porösem Glas. Eine Kolonne ($2,2 \times 65$ cm) enthaltend 160 g hydrophobisiertes⁴⁾ *Corning® Controlled-Pore Glass* CPG-10⁵⁾ (Porendurchmesser 75 Å) wurde mit der oben beschriebenen optischen Monitor-Vorrichtung versehen. Bei konstanter Durchflusgeschwindigkeit von 78 ml/Std. wurden 0,240 g des Testgemisches $PS_L/Boc-Phe-OH$ 5:1 im Verlaufe von 3,5 Std. quantitativ in die Komponenten aufgetrennt. PS_L wurde zwischen 110 ml und 160 ml, *Boc-Phe-OH* zwischen 185 ml und 260 ml eluiert. Als Lösungsmittel diente Methylenchlorid.

b) Verankerung der ersten Aminosäure.

Chlormethylpolystyrol (II); Standardverfahren. Einer Lösung von 3,0 g PS_L (I) in 16 ml Chlormethyl-methyläther wurden 4,0 ml einer 5proz. Lösung von wasserfreiem Zinkchlorid im gleichen Lösungsmittel (entsprechend 20 mg $ZnCl_2$ oder 0,67% bezogen auf PS_L) zugesetzt. Die Lösung wurde unter Feuchtigkeitsschluss 15 Std. bei Raumtemp. stehen gelassen, das Lösungsmittel anschliessend im Vakuum verdampft, der Rückstand in 20 ml Dioxan aufgelöst und das gewünschte Produkt durch Einrühren der Lösung in 500 ml Wasser in gut filtrierbarer Form gewonnen. Nach wiederholtem Verreiben und Waschen mit Methanol und Wasser (bis Cl-frei) und Trocknen erhielt man 3,05 g (96%). Cl-Gehalt: 3,98% (1,12 mval/g). Für die Abhängigkeit der Chlorbeladung von der Menge des eingesetzten $ZnCl_2$ -Katalysators vgl. Fig. 2.

Boc-Phe-OCH₂-PS_L (IIIa). Eine Lösung von 1,62 g (6,1 mmol) *Boc-Phe-OH* in 50 ml Methanol wurde mit 2,66 ml (5,8 mmol) einer 2,18 N methanolischen Lösung von Triton B versetzt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 ml Dioxan aufgelöst. Neuerliches Eindampfen zur Trockene und Lyophilisieren des Rückstandes aus Dioxan (ca. 20 ml) gab ein weisses Pulver, welches nach 2stdg. Trocknen im HV. über P_2O_5 mit 5,0 g Chlormethylpolystyrol (II) (Cl-Gehalt: 0,611 mval/g, entspricht total 3,06 mval Cl) versetzt wurde. Das Gemisch, in 100 ml wasserfreiem Dioxan (dest. über CaH_2) gelöst, wurde 15 Std. bei 75° gerührt und dann auf ca. 15 ml konzentriert. Zur Abtrennung der Hauptmenge des überschüssigen Tritoniumsalzes wurde das viskose Konzentrat in 200 ml Methanol eingegossen, worauf das gewünschte Produkt als Harz ausfiel. Nach Abgiessen der überstehenden Flüssigkeit und Trocknen des Harzes wurde dieses durch Gelfiltration an *Bio-Beads* S-X1 von niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Die

³⁾ Kommerziell erhältlich bei *Mann Research Laboratories*, Orangeburg, N. Y. 10962, U.S.A.; aus der Serie Polystyrene-Standard Molecular Weight Markers; hergestellt nach der Methode von *Allures et al.* [30];
 $\bar{M}_w = 20800 \pm 4\%$; $\bar{M}_v = 20400 \pm 3\%$; $\bar{M}_n = 20200 \pm 3\%$.

⁴⁾ Für die Hydrophobisierung vgl. [12].

⁵⁾ Erhältlich bei *Corning Glass Works*, Corning N. Y., 14830, U.S.A.

Polymerfraktion wurde aus wenig Dioxan lyophilisiert und das so erhaltene weisse Pulver bis zur Gewichtskonstanz getrocknet: 5,07 g, N-Gehalt: 0,73% (entspricht 0,52 mmol Phe/g); Restchlorgehalt: 0,31% (entspricht 0,087 mval Cl/g); Umsatz: 85%. Zur Phe-Gehaltsbestimmung wurde eine Probe im verschlossenen Rohr bei 105° während 24 Std. mit 12N HCl/Dioxan 1:1 hydrolysiert. Der Aminosäuregehalt des Hydrolysates wurde spektrophotometrisch nach Rosen [14] bestimmt. Es wurde ein Phe-Gehalt von 0,50 mmol/g im substituierten Träger IIIa gefunden. Dünnschichtchromatographisch (2A, 2B und 2B+5% Essigsäure) liess sich in IIIa kein freies Boc-Phe-OH nachweisen.

c) *Aufbau der Kette.*

Beispiel: Boc-Tyr(Bzl)-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (X). Zu einer Lösung von 0,75 g (2 mmol) Boc-Tyr(Bzl)-OH in 20 ml Methanol wurden 0,5 ml (1,1 mmol) einer 2,18N methanolischen Lösung von Triton B gegeben. Die nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum, Lyophilisieren des Rückstandes aus Dioxan und Trocknen erhaltene, ca. zur Hälfte in der Form des Tritoniumsalzes vorliegende Acylkomponente (A) wurde, wie weiter unten beschrieben, direkt mit dem Hydrochlorid der Aminkomponente (B) umgesetzt. In einem separaten Gefäss wurden 2,33 g Boc-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (IXa) (N-Gehalt: 4,0%; Peptidbeladung: 0,475 mmol/g; Restchlorgehalt: 0,47%) in 20 ml Dioxan aufgelöst. Die auf ca. 10° gekühlte Lösung wurde mit 100 ml 4,6N HCl in Dioxan versetzt und die resultierende, klare Reaktionslösung 30 Min. bei Raumtemp. stehen gelassen⁶⁾. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man einen in Dioxan schwerlöslichen Rückstand, welcher zur Abtrennung der Hauptmenge HCl im Gemisch mit Dioxan (30 ml) gefroren und lyophilisiert wurde. Das als weisses Pulver erhaltene Hydrochlorid der Aminkomponente (B) wurde mit 20 ml Methylenchlorid überschichtet. Dem Gemisch wurde eine Lösung von (A) in 30 ml Methylenchlorid zugesetzt. Nach wenigen Min. lag eine klare Lösung vor. Diese wurde mit einer Lösung von 0,41 g (2 mmol) DCCl in 5 ml Methylenchlorid versetzt. Nach 4 Std. bei Raumtemp. wurde das nun im Kaiser-Test [21] negativ reagierende Reaktionsgemisch auf ca. 20 ml eingengt, der ausgeschiedene DCH durch Filtration entfernt und das Filtrat, nach Zugabe von 0,5 ml Triäthylamin⁷⁾, gefiltriert. Für den Verlauf des Chromatogramms vgl. Fig. 1. Das in der Polymerfraktion eluierte Material wurde nach Lyophilisieren aus Dioxan als weisses Pulver erhalten: 2,51 g (97%), N-Gehalt: 4,33%; Peptidbeladung: 0,44 mmol/g; Restchlorgehalt: 0,40%; Peptidbeladung: Ber. 0,42 mmol/g. Dünnschichtchromatographisch ist kein Boc-Tyr(Bzl)-OH nachweisbar (2A).

d) *Ablösen des Peptides vom Träger.*

Abspaltung mittels HB/F₃CCOOH. Eine Lösung von 1,022 g Boc-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OCH₂-PS_L (IXa) (N-Gehalt: 5,07%; Peptidbeladung: 0,603 mmol/g) und 0,3 g Anisol in 25 ml Methylenchlorid wurde mit 25 ml F₃CCOOH versetzt. Durch die klare Lösung leitete man während 1 Std. einen schwachen Strom von bromfreiem HBr, und hierauf während 15 Min. einen solchen von N₂. Dann wurde das nun milchige Reaktionsgemisch zur Trockene eingedampft, der Rückstand getrocknet und zwischen Wasser und Methylenchlorid (je 50 ml) über 4 Scheidetrichter verteilt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden auf wenige ml konzentriert, das Konzentrat durch eine Säule mit Dowex 3 (Acetat-Form) (Dimensionen: 0,6 × 15 cm) gelassen und das Produkt IXc durch Lyophilisieren aus Wasser als weisses Pulver erhalten: 334 mg (92%); Dünnschichtchromatographisch einheitlich (2A, 2B, 3A, 3B); Aminosäureanalyse (Hydrolyse: 15 Std., 118°, 6N HCl): Val 1,00; Pro 0,98; Phe 1,01; His(Bzl) vorhanden, aber nicht bestimmt.

Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und nach Eindampfen auf ca. 10 ml zur Abtrennung von niedermolekularen Komponenten (Anisol, Bromanisol) durch eine Kolonne mit Bio-Beads S-X1 (4 × 200 cm) gelassen. Der Polymerpik lieferte nach Abdampfen des Lösungsmittels, Lyophilisieren des Rückstandes aus Dioxan und Trocknen 0,615 g (94%) eines Produktes mit einem N-Gehalt: 0,21%, Br: 8,18%. Berechnet für quantitativen Umsatz: N: 0,0%;

⁶⁾ Bei höher beladenen Trägern fällt das Produkt oft nach wenigen Min. aus und eine vollständige Deblockierung ist nicht gewährleistet. Dieser Mangel kann in der Regel durch Arbeiten bei niedrigeren Konzentrationen behoben werden.

⁷⁾ Die Zugabe von Triäthylamin zum Trenngemisch verhindert, dass an basische Aminosäure (-His(Bzl)-) ionisch gebundene Acylkomponente in der Polymerfraktion auftritt. Es wurde erstmals bei der Reinigung von IXa zugesetzt.

Br: 7,6%. Auf Grund des ermittelten Reststickstoffgehaltes von 0,21% ergibt sich die Ausbeute der Ablösereaktion zu 96%.

Peptid-Freisetzung mittels HF. Im zweiten Gefäss einer vereinfachten HF-Apparatur nach Sakakibara [31] wurde eine auf 0° gekühlte Lösung von IXa (1,013 g; Peptidbelastung: 0,603 mmol/g) und 0,3 g Anisol in 10 ml Methylenchlorid vorgelegt. Im Verlaufe einer Std. wurde unter Rühren und Eiskühlung ca. 10 ml flüssiges HF einkondensiert, welches aus dem ersten Teflongefäss überdestilliert wurde. Nach weiteren 30 Min. bei 0° wurden HF und Methylenchlorid durch Überleiten eines trockenen N₂-Stromes entfernt. Der im Vakuum über KOH getrocknete Rückstand wurde zwischen Wasser (je 50 ml) und Methylenchlorid (je 100 ml) über 6 Scheidetrichter verteilt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden auf wenige ml eingengt, das Konzentrat durch eine Säule mit Dowex 3 (Acetat-Form) gelassen und mit Wasser eluiert. Nach Eindampfen und Lyophilisieren des Rückstandes aus Wasser erhielt man 329 mg chromatographisch reines H-Val-His(Bzl)-Pro-Phe-OH (IXc); identisch mit dem Produkt des vorangehenden Versuches. Die Ausbeute der Ablösungsreaktion berechnet auf die Peptidbelastung von IXa beträgt 90%.

Hydrazinolyse. Eine Lösung von 1,008 g IXa in 40 ml Dioxan wurde mit 15 ml Hydrazinmonohydrat/Methanol 1:1 versetzt. Der Ablauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 3 Std. bei Raumtemp. zeigte die im System (2) nicht laufende Trägerkomponente keine ninhydrinpositive Reaktion mehr. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand aus Dioxan lyophilisiert und anschliessend in Methylenchlorid gelöst und auf die übliche Weise an *Bio-Beads* S-X1 in die Komponenten aufgetrennt. Gefasst wurden 0,574 g Polymeres (N-Gehalt: 0,52%) und 0,396 g Hydrazid (IXb). Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen (1), (2), (3) und (4). Die Ausbeute dieser Reaktion bestimmt sich zu 93% (berechnet auf die Menge des erhaltenen IXb), zu 90% (berechnet auf Grund des Reststickstoffgehaltes im Trägermaterial). Aminosäureanalyse (Hydrolyse: 15 Std., 118°, 6N HCl): Val 1,00; Pro 0,98; Phe 1,02; His(Bzl) vorhanden, aber nicht bestimmt.

Behandlung mit Trifluoressigsäure. Eine Lösung von 1,150 g IXa in 25 ml Methylenchlorid wurde langsam unter Rühren bis zum Trübungspunkt mit F₃CCOOH versetzt (total 25 ml). Nach 24 Std. bei 25° wurde das Gemisch zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Wasser verrieben, abgesaugt und mit mehreren Portionen Wasser gewaschen. Der wässrige Auszug wurde wie oben beschrieben an Dowex 3 ausgetauscht und lyophilisiert: 81 mg IXc, entsprechend 20% Ausbeute. Dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Ammonolyse. 1,000 g Boc-Phe-Gly-OCH₃-PS_L (VIIIa) (N-Gehalt: 2,90%; Peptidbelastung: 1,03 mmol/g) wurde in 100 ml Dioxan/Methanol 4:1 gelöst, die Lösung auf 0° gekühlt und unter Rühren und Eiskühlung ca. 50 ml trockenes NH₃ einkondensiert. Nach einer Std. wurde das überschüssige NH₃ mittels N₂ abgeblasen, der Rest zur Trockene eingedampft und der Rückstand an *Bio-Beads* S-X1 gut in zwei Komponenten aufgetrennt. In der Polymerfraktion konnten nach Lyophilisieren und Trocknen nur noch Spuren gebundener Aminosäuren nachgewiesen werden. Die später eluierte niedermolekulare Fraktion erwies sich nach Dünnschichtchromatographie als ein Gemisch von Boc-Phe-Gly-OCH₃ und Boc-Phe-Gly-NH₂ (VIIIb) im Verhältnis von ca. 1:1. Eine neuerliche Behandlung dieses Gemisches mit NH₃/Methanol gab 297 mg (90%) des Dipeptidamides VIIIb.

e) *Kinetische Experimente.*

Boc-Pro-OH wurde nach Loffet [13] mit Chlormethylpolystyrol (II) und mit «*Merrifields Peptide Resins*» (Calbiochem, 2% Divinylbenzol) verestert und auf übliche Weise mit 6,5N HCl/Dioxan die entsprechenden Esterhydrochloride hergestellt (Beladungen: 0,66 mmol/g resp. 0,44 mmol/g). Zur Bestimmung der Kinetik einer Aktiv-Ester-Kupplung (vgl. Fig. 3.) wurde eine 0,01M Lösung von Z-Ala-ONP und Esterhydrochlorid (bei C eine Suspension) in Chloroform mit 1,2 Äquivalenten Triäthylamin versetzt und die Bildung des *p*-Nitrophenols durch Entnahme von Proben und Verdünnen auf das 100fache photometrisch bei 315 nm ermittelt (Temperatur 24°, $\epsilon = 1,07 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Als Leerwert wurde die Reaktionslösung ohne Aminkomponente (bei B mit einem entsprechenden Zusatz von PS_L (I)) eingesetzt. Die gemessene Extinktion wurde entsprechend der abnehmenden Konzentration des aktiven Esters, welcher bei 315 nm noch eine geringe Endabsorption zeigt ($\epsilon = \text{ca. } 8 \cdot 10^2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mit einer Korrektur versehen

$$\left[+ \frac{0,08}{1,07} \cdot E_{\text{gemessen}} \right]$$

Ein Kontrollversuch mit Z-Ala-ONP und Triäthylamin zeigte, dass die Freisetzung von *p*-Nitrophenol ohne Aminkomponente vernachlässigt werden kann. Die in der graphischen Darstellung angegebenen Fehlerschranken stammen aus dem absoluten Fehler ($\pm 0,01$; P ca. 0,05) der Transmissionsmessung ab. Die Steigung der Geraden in den «linearen Bereichen» wurde nach der «Methode der kleinsten Quadratsumme» ermittelt.

Die in Fig. 3 angeführte kinetische Gleichung gilt auch für die Systeme B und C, in denen die Aminkomponente nur im Partialvolumen des Trägers vorliegt.

Auch bei einem Fehler von ca. 5% für die Aminkonzentration (Aminosäuregehalt des Trägers) ist unsere Auswertung noch zulässig, da innerhalb der Messfehler unseres analytischen Systems (photometrische Bestimmung) Linearität noch gewährleistet ist. Der relative Fehler der Aminkonzentrationen überträgt sich in vergleichbarer Grössenordnung auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten.

Für sorgfältige technische Mitarbeit sind wir den Herren *U. S. Fritschi* und *E. Spiesser* zu Dank verpflichtet. Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielaboratorium (Leiter: Herr *E. von Arx*), Elementaranalysen in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Leiter: Herr Dr. *H. Wagner*) ausgeführt.

Herrn Dr. *A. Joehl*, unter dessen Leitung diese Arbeit durchgeführt wurde, danken wir bestens für anregende Diskussionen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. B. Merrifield*, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2149 (1963).
- [2] *R. B. Merrifield*, Biochemistry **3**, 1385 (1964).
- [3] *R. B. Merrifield*, Advan. Enzymol. **32**, 221 (1969).
- [4] *J. M. Stewart & J. D. Young*, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman & Co., San Francisco 1969.
- [5] *E. Wünsch*, Angew. Chem. **83**, 773 (1971).
- [6] *M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin & I. V. Kozhevnikova*, Tetrahedron Letters **1965**, 2323.
- [7] *B. Green & L. A. Garson*, J. chem. Soc. (C) **1969**, 401.
- [8] *Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin & I. V. Kozhevnikova*, J. Gen. Chem. USSR **38**, 2546 (1968).
- [9] *Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin & I. V. Kozhevnikova*, J. Gen. Chem. USSR **38**, 2551 (1968).
- [10] *M. Mutter, H. Hagenmaier & E. Bayer*, Angew. Chem. **83**, 883 (1971).
- [11] IUPAC – IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. Biol. Chemistry **247**, 977 (1972).
- [12] Chromatography Manual, Corning® Controlled-Pore Glass, CPG-10 Series, Compiled by C. Pidacks, Corning Glass Works, Corning, New York 1971.
- [13] *A. Loffet*, Int. J. Protein Res. **3**, 297 (1971).
- [14] *E. W. Yemm & E. C. Cocking*, Analyst **80**, 209 (1955); *H. Rosen*, Arch. Biochem. Biophys. **67**, 10 (1957); vgl. auch *J. P. Greenstein & M. Winitz*, Chemistry of Amino Acids, Vol. 2, Wiley, New York, N. Y., 1961, p. 1309.
- [15] *F. Chuen-Heh Chou, R. K. Chawla, R. F. Kibler & R. Shapira*, J. Amer. chem. Soc. **93**, 267 (1971).
- [16] *H. Beyerman & H. Maassen van den Brink-Zimmermanová*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **87**, 1196 (1968).
- [17] *B. F. Gisin & R. B. Merrifield*, J. Amer. chem. Soc. **94**, 3102 (1972).
- [18] *M. C. Khosla, R. R. Smeby & F. M. Bumpus*, *ibid.* **94**, 4721 (1972).
- [19] *H. C. Beyerman, E. W. B. de Leer & W. van Vossen*, J.C.S. Chem. Commun. **1972**, 929.
- [20] *H. Schüssler & H. Zahn*, Chem. Ber. **95**, 1076 (1962).
- [21] *E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger & P. I. Cook*, Anal. Biochem. **34**, 595 (1970).
- [22] *R. B. Merrifield*, Recent Progr. Hormone Res. **23**, 451 (1967).
- [23] *L. C. Dorman & L. D. Markley*, J. Med. Chem. **14**, 5 (1971).
- [24] *W. Parr, C. Yang & G. Holzer*, Tetrahedron Letters **1972**, 101.
- [25] *J. J. Maher, M. E. Furey & L. J. Greenberg*, Tetrahedron Letters **1971**, 27.
- [26] *A. Losse*, Tetrahedron Letters **1971**, 4989.

- [27] *V. Gut & J. Rudinger*, Proc. of the 9th European Peptide Symposium North Holland Publishing Company, Amsterdam (1968), p. 185.
 [28] *G. Losse & R. Ulbricht*, Tetrahedron 28, 5823 (1972).
 [29] *P. Fankhauser*: Backbone-Acylierung und Aminoacylinlagerung unter Festphasenbedingungen. 12. Europäisches Peptidsymposium, Schloss Reinhardbrunn, Sept. 1972.
 [30] *T. Altares, D. P. Wyman & V. R. Allen*, J. Polymer Sci. A2, 4533 (1964).
 [31] *S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada & Y. Kishida*, Peptides, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1967, p. 44.

122. Synthese von rac. N-*t*-Butyloxycarbonyl-thiobenzylglycyl-thiobenzylglycin und Versuche zur Darstellung des 3,6-Epidithio-2,5-piperazindions

von **T. Petrzilka** und **Ch. Fehr**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

(21. II. 73)

Summary. The synthesis of rac. N-*t*-butyloxycarbonylthiobenzylglycyl-thiobenzylglycine is described. Cyclisation experiments to the corresponding 3,6-epi-dithio-piperazindion(2,5) were unsuccessful.

Verschiedene Antibiotica, wie z.B. Aranotin [1], Gliotoxin [2], Sporidesmin [3], Chaetocin [4], besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal ein 3,6-Epidithio-2,5-piperazindiongerüst.

In der Literatur sind verschiedene Synthesen von N-alkylierten [5] [6] sowie von C- und N-alkylierten 3,6-Epidithio-2,5-piperazindionen [7] beschrieben. Dabei wurde stets die Disulfidbrücke in das 2,5-Piperazindion eingebaut. Ein Versuch, ein 3,6-Dithio- (oder 3,6-Epidithio-) 2,5-piperazindion durch Dimerisierung von 2-Thiozimtsäureamiden zu bilden, scheiterte aus sterischen Gründen [8].

Die erwähnten N- oder C- und N-alkylierten Diketopiperazine eignen sich als Modellverbindungen, jedoch kaum als Zwischenprodukte für eine Synthese der entsprechenden Antibiotica, da eine spätere Entalkylierung schwierig sein dürfte.

Aus diesem Grunde interessierte uns die Synthese des 3,6-Dithiobenzyl-2,5-piperazindions (**1**), welches nach bekannten Methoden [9] in das 3,6-Epidithio-2,5-piperazindion (**2**) hätte übergeführt werden können.



Als ideales Ausgangsprodukt betrachteten wir α -Amino- α -thiocarbonsäuren, denn bei diesen fällt das Problem der späteren Schwefeinführung dahin, und eine Racemat-Trennung in einem frühen Stadium der Synthese ermöglicht den stereochemisch richtigen Aufbau des Diketopiperazins.