

Synthese von Oligopeptiden aus α -Aminoisobuttersäure und Glycin

Von G. FAUST und H. LANGE

Inhaltsübersicht

Es wird die Darstellung von Peptiden und Peptidderivaten aus α -Aminoisobuttersäure und Glycin beschrieben. Ausbeutevergleiche zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der angewandten Methode und der Art der endständigen und anzuknüpfenden Aminosäure.

Obwohl bereits im Jahre 1889 eine Synthese der α -Aminoisobuttersäure beschrieben wurde¹⁾, sind unseres Wissens nur wenige α -Aminoisobuttersäure enthaltende Peptide bekannt. BERGMANN und Mitarbeiter²⁾ synthetisierten nach der Carbobenzoylchlorid-Methode neben anderen Dipeptiden Glycyl- α -aminoisobuttersäure und α -Aminoisobutyrylglycin durch Anknüpfung des entsprechenden Aminosäureesters und anschließende Verseifung. LANGENBECK und KRESSE³⁾ stellten α -Aminoisobutyrylglycin nach einer verbesserten BAILEY-Synthese durch Umsetzung von α -Aminoisobuttersäure-N-carbonanhydrid mit Glycinäthylester und folgende Verseifung des Peptidesters dar.

α -Aminoisobuttersäure wurde lange als eine nicht natürlich vorkommende Aminosäure betrachtet, konnte aber in Caseinhydrolysaten⁴⁾ nachgewiesen werden. Da die papierchromatographische Abtrennung der α -Aminoisobuttersäure von der in tierischen und pflanzlichen Eiweißhydrolysaten gefundenen α -Aminobuttersäure bei Anwendung bestimmter Lösungsmittelgemische (z. B. Butanol–Eisessig–Wasser) nicht möglich oder schwierig ist, kann α -Aminoisobuttersäure bei der Analyse von Naturprodukten leicht übersehen werden.

Die Versuche zur Darstellung von α -Aminoisobuttersäure enthaltenden Peptiden sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob durch Sub-

¹⁾ E. DUVILLIER u. F. CHANCEL, Bull. Soc. chim. France [3] 7, 102 (1889).

²⁾ M. BERGMANN, L. ZERVAS, J. S. FRUTON, S. SCHNEIDER u. F. SCHLEICH, J. biol. Chem. 109, 325 (1935).

³⁾ W. LANGENBECK u. P. KRESSE, J. prakt. Chem. [4] 2, 261 (1955).

⁴⁾ Y. OSHIMA, S. YOSHIHARA u. Y. SAHAMOTO, J. Agr. Chem. Soc. Japan 27, 102 (1953); C. A. 49, 14860c.

stitution des H-Atoms am α -C-Atom von α -Aminosäuren durch einen Alkylrest die Anwendung der üblichen Methoden für Peptidsynthesen eingeschränkt wird oder nicht. Außerdem wurde bisher noch nicht geprüft, ob den α -Aminoisobuttersäure enthaltenden Peptiden analoge physiologische und klinisch-therapeutische Bedeutung zukommt wie der α -Aminoisobuttersäure selbst⁵⁾.

Die für Peptidsynthesen benötigte N-Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäure wurde durch Umsetzung des Na-Salzes der α -Aminoisobuttersäure mit Carbobenzoylchlorid nach Art einer SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion in 75proz. Ausbeute erhalten.

Zum Schutz der C-terminalen Gruppe werden in der Peptidchemie die Benzylester bevorzugt, weil die Benzylester durch katalytische Hydrierung leicht gespalten werden können. α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid wurde nach der Methode von ERLANGER und HALL⁶⁾ in guter Ausbeute erhalten. Der freie α -Aminoisobuttersäurebenzylester zeichnet sich durch eine besondere Stabilität aus. Im allgemeinen sind freie Aminosäureester, besonders die Benzylester, wenig beständig. α -Aminoisobuttersäurebenzylester kann dagegen im Vakuum unzerlegt destilliert und – in Ampullen eingeschmolzen – monatelang unverändert aufbewahrt werden.

Die beiden einfachsten Peptide, die sich aus α -Aminoisobuttersäure und Glycin synthetisieren lassen, wurden zunächst über die N-geschützten Aminosäurechloride dargestellt. N-Carbobenzoxy-glycyl- α -aminoisobuttersäure wurde aus N-Carbobenzoxy-glycylchlorid und α -Aminoisobuttersäureäthylester und anschließende Verseifung mit NaOH erhalten. Bei der Umsetzung von N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyrylchlorid mit Glycinäthylester mußte die Reaktionstemperatur unterhalb -30°C gehalten werden, da sich bei Temperaturen bis zu -15°C N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyrylchlorid leicht zum α -Aminoisobuttersäure-N-carbonanhydrid umwandelt.

Da die Ausbeuten nach diesem Verfahren nicht befriedigend waren, wurde versucht, die Dipeptide nach der gemischten Anhydrid-Methode⁷⁾ unter Verwendung von Isovalerylchlorid zu synthetisieren. Die in 85–92proz. Ausbeute erhaltenen N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycinester können nur schwierig gereinigt werden. Ferner verläuft die Verseifung der Dipeptidester unter verschiedenen Bedingungen mit schlechten Ausbeuten.

⁵⁾ H. KOHL, Aminosäuren, ihre theoretische und praktische Bedeutung für die klinische Therapie, Editio Cantor K. G. Aulendorf i. Württ. 1954.

⁶⁾ B. F. ERLANGER u. R. M. HALL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5781 (1954).

⁷⁾ J. R. VAUGHAN u. R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 5553 (1951).

Um die Verseifung der Peptidester zu vermeiden, wurde deshalb zur Peptidsynthese die gemischte Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäureäthylester angewandt⁸⁾. Bei den Peptidsynthesen mit α -Aminoisobuttersäure und Glycin konnte gezeigt werden, daß bei dieser Methode die Konstitution des Aminosäureanions und nicht die der Aminosäurekomponente des gemischten Anhydrids für die Peptid-Ausbeute bestimmend ist. Wird das gemischte Anhydrid von α -Aminoisobuttersäure und Chlorameisensäureäthylester mit dem Na-Salz von Glycin umgesetzt, so liegen die Ausbeuten bei 80% d. Th. Dagegen können nur Ausbeuten von 6–12% d. Th. erreicht werden, wenn man unter analogen Bedingungen das gemischte Anhydrid von Glycin und Chlorameisensäureäthylester mit dem Na-Salz der α -Aminoisobuttersäure umsetzt. Das der Aminogruppe benachbarte C-Atom des α -Aminoisobuttersäureanions trägt zwei Methylgruppen, die offenbar den nucleophilen Angriff des Aminosäureanions sterisch behindern. Daß die Aminosäurekomponenten des gemischten Anhydrids ohne wesentlichen Einfluß auf die Ausbeuten bei der Synthese von Carbobenzoxy-peptiden sind, ist der Tab. 1 zu entnehmen. Während die Darstellung von N-Carbobenzoxy-

Tabelle 1

Ausbeuten der N-Cbo-peptide nach der gemischten Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäureäthylester

Cbo-gly-gly	65–68% d. Th.
Cbo- α -AiB- α -AiB	9,3%
Cbo- α -AiB-gly	75–81%
Cbo-gly- α -AiB	6–12%
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB	11–12%
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB-gly	78–82%
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB-gly- α -AiB	5,3–6,2%

Cbo = Carbobenzoxy, α -AiB = α -Aminoisobuttersäure, gly = Glycin

α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure und N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure aus den gemischten Anhydriden der entsprechenden Carbobenzoxy-Di- bzw. Carbobenzoxy-Tetrapeptide und α -Aminoisobuttersäureanionen nur in 6–12proz. Ausbeute gelingt, wird N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycin in 80proz. Ausbeute nach der gleichen Methode erhalten. Aus den bei der Aufarbeitung anfallenden Ätherextrakten können unumgesetzte Anteile der eingesetzten

⁸⁾ TH. WIELAND u. A. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951).

N-Carbobenzoxy-amino-säuren bzw. der N-Carbobenzoxy-peptide zurückgewonnen werden, indem man die getrockneten Ätherextrakte mit Petroläther versetzt.

Bei der Darstellung von N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycin und N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure nach der gemischten Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäureäthylester ist darauf zu achten, daß bei der Aufarbeitung nur mit n-HCl kongosauer gemacht wird, da bei Anwendung konzentrierter Salzsäure oder bei einem niedrigeren p_H die Carbobenzoxy-Tetra- bzw. Carbobenzoxy-Pentapeptide sehr rasch hydrolysiert werden. Als Spaltprodukt des Carbobenzoxy-Tetra- wie auch des Carbobenzoxy-Pentapeptids wurde N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure neben Glycin bzw. Glycin und α -Aminoisobuttersäure nachgewiesen, jedoch nicht Glycyl- α -aminoisobuttersäure, wie man bei einer direkten Spaltung des N-Carbobenzoxy-Pentapeptids in N-Carbobenzoxy-Tripeptid und Dipeptid erwarten sollte. Die besondere Stabilität von N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure spricht für die Beständigkeit von Tripeptiden und deren höheren Homologen, wie sie bei anderen Untersuchungen festgestellt wurde. Für die Synthese größerer Peptide ist die gemischte Anhydrid-Methode von Chlorameisensäureäthylester günstig, da die Rohprodukte der C-terminal ungeschützten N-Carbobenzoxy-Tri-, N-Carbobenzoxy-Tetra- und N-Carbobenzoxy-Pentapeptide durch einmaliges Umkristallisieren aus Wasser analysenrein und kristallin erhalten werden.

Die geringen Ausbeuten bei der Darstellung von Peptiden, die als C-terminale Aminosäure α -Aminoisobuttersäure enthalten, kann man vermeiden, wenn man bei der gemischten Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäureäthylester an Stelle der Natriumsalze von Aminosäuren deren Ester verwendet⁹⁾. Die Anwendung der Ester ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn die N-Carbobenzoxy-peptidester in besseren Ausbeuten erhalten werden und sich leicht in C-terminal ungeschützte Peptide überführen lassen. Dies trifft für die N-Carbobenzoxy-peptid- α -aminoisobuttersäurebenzylester zu, da bei Anwendung von α -Aminoisobuttersäurebenzylester an Stelle von α -Aminoisobuttersäure-anionen nach der gemischten Anhydridmethode mit Chlorameisensäureäthylester unerwartet gute Ausbeuten erhalten wurden und sich die Benzylester durch katalytische Hydrierung in 95–99proz. Ausbeute spalten lassen: z. B. beträgt die Ausbeute an N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-

⁹⁾ TH. WIELAND u. K. W. OHLY, Liebigs Ann. Chem. **605**, 179 (1957).

glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure mit dem Na-Salzer der α -Aminoisobuttersäure 5,3–6,2% d. Th., während man den Benzylester des entsprechenden Pentapeptids in 72–77proz. Ausbeute erhält.

Bei der Synthese von Carbobenzoxy-Peptidestern mit Chlorameisenäthylester können an Stelle der freien Aminosäureester auch deren Hydrochloride eingesetzt werden, wenn man zum Reaktionsgemisch die berechnete Menge Triäthylamin zufügt und wie üblich aufarbeitet. Die nach dieser Methode dargestellten Carbobenzoxy-Peptidester fallen bei Einsatz der freien Aminosäureester wie auch deren Hydrochloriden in großer Reinheit an, jedoch liegen die Ausbeuten bei Anwendung von α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid häufig niedriger als bei Synthesen mit freiem Ester.

Für Peptidsynthesen mit α -Aminoisobuttersäure sind ferner die gemischten Anhydride von Carbobenzoxy-aminosäuren oder Carbobenzoxy-peptiden mit Dichlorphosphorsäure zu empfehlen¹⁰⁾. Man erhält sie nach WIELAND und HEINKE, indem man POCl_3 auf Carbobenzoxy-aminosäuren oder Carbobenzoxy-peptide in Gegenwart eines tertiärenamins einwirken läßt. Die gemischten Anhydride können ohne Isolierung mit Aminosäureestern zu Peptidestern umgesetzt werden. Neben der direkten Umsetzung von Carbobenzoxy-peptiden, Aminosäureestern und tertiärem Amin in Tetrahydrofuran mit POCl_3 ermöglicht die POCl_3 -Methode auch den Einsatz von Aminosäureesterhydrochloriden oder -hydrobromiden mit der berechneten Menge Triäthylamin. Dieser Umstand wurde bei der Darstellung von N-Carbobenzoxy-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurebenzylester ausgenützt, da das bei der Abspaltung der Carbobenzoxygruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig erhaltene α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurebenzylesterhydrobromid direkt umgesetzt werden konnte; denn die Freisetzung des Pentapeptidbenzylesters aus seinem Hydrobromid mit Triäthylamin und anschließende Isolierung ist mit Ausbeuteverlusten verbunden.

Tabelle 2

Cbo- α -AiB-gly-benz.	78–83% d. Th.
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB-benz.	60–74% d. Th.
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB-gly-benz.	32–36% d. Th.
Cbo- α -AiB-gly- α -AiB-gly- α -AiB-benz.	72–77% d. Th.
Cbo-gly- α -AiB-gly- α -AiB-gly- α -AiB-benz.	32–34% d. Th.

Cbo = Carbobenzoxy, α -AiB = α -Aminoisobuttersäure, gly = Glycin, -benz. = benzylester

¹⁰⁾ TH. WIELAND u. B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. 599, 70 (1956).

In der Tab. 2 sind Angaben über Ausbeuten an Carbobenzoxypeptidestern nach der Methode der gemischten Anhydride mit POCl_3 zusammengestellt. Es ist noch zu erwähnen, daß die Carbobenzoxypeptidester nach dieser Methode besonders rein erhalten werden.

Bei Anwendung von Carbodiimiden¹¹⁾ zur Synthese von α -Aminoisobuttersäure enthaltenden Peptiden wurden ebenfalls gute Ausbeuten erzielt, jedoch waren die Peptidderivate besonders mit dem bei der Reaktion gebildeten symmetrisch substituierten Harnstoff verunreinigt. Z. B. wurden nach dieser Methode N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure-benzylester und N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurebenzylester in 45–50 bzw. 72–77proz. Ausbeute dargestellt. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen¹²⁾ fällt der bei Anwendung von Dicyclohexylcarbodiimid gebildete Dicyclohexylharnstoff unvollständig aus und ist durch Umkristallisation der Carbobenzoxy-peptidester aus üblichen organischen Lösungsmitteln kaum restlos abzutrennen. Am zweckmäßigsten verlief eine stufenweise Reinigung mit Dimethylformamid. Während der substituierte Harnstoff in diesem Lösungsmittel in der Kälte relativ schwer löslich ist, werden Carbobenzoxypeptidester unter gleichen Bedingungen gut gelöst. Die Reaktionsdauer¹²⁾ wurde bei der Carbodiimid-Methode teilweise bis zu 48 Stunden verlängert. Vergleichende Ansätze mit verschiedenen Reaktionszeiten ergaben bei der Darstellung von Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurebenzylester bei 25–30 Stunden maximale Ausbeuten. Bei Anwendung von nach der Carbodiimid-Methode dargestellten Peptidderivaten zur Synthese größerer Peptide wurden außer bei der katalytischen Hydrierung keine durch Spuren von N.N'-Dicyclohexylharnstoff bedingte Störungen beobachtet.

Aus den Carbobenzoxy-peptidbenzylestern können die freien Peptide durch katalytische Hydrierung in sehr guter Ausbeute erhalten werden (94,7–99,5% d. Th.). Zur selektiven Abspaltung der Carbobenzoxygruppe erwies sich eine Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig nach BEN-ISHAÏ¹³⁾ als gut geeignet. Alle auf diese Weise dargestellten Peptidbenzylesterhydrobromide sind außerordentlich stark hygroskopisch,

¹¹⁾ J. C. SHEEHAN u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955); **78**, 1367 (1956); J. org. Chemistry **21**, 439 (1956); H. G. KHORANA, Chem. and Ind. **1955**, 1087; J. Chem. Soc. (London) **1952**, 2081; **1953**, 2257; J. Amer. chem. Soc. **76**, 3517, 3522 (1954).

¹²⁾ H. G. KHORANA, Chem. and Ind. **1955**, 1087.

¹³⁾ D. BEN-ISHAÏ u. A. BERGER, J. org. Chemistry **17**, 1564 (1953).

weshalb auf eine Charakterisierung durch Elementaranalyse und Schmelzpunkt verzichtet wurde.

Die Löslichkeit der Carbobenzoxy-peptide in kochendem Wasser nimmt in der Reihenfolge Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycin, Carbobenzoxy- α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure, Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycin, Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure rasch ab und in Tetrahydrofuran bei 20 °C fast linear zu.

Bemerkenswert ist, daß die freien Peptide mit α -Aminoisobuttersäure am N- und C-terminalen Ende wie z. B. α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure und α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure 1 Mol Wasser addieren, das trotz 20stündigem Trocknen bei 150 °C im Ölpumpenvakuum nicht abgespalten wird. Die freien Peptide sind zum Teil hygroskopisch.

Die Synthese größerer Peptide aus Peptidderivaten und Aminosäuren sind im Vergleich zur Synthese aus zwei niedrigeren Peptiden sehr zeitraubend und mit schlechten Ausbeuten verbunden. Deshalb wurde geprüft, ob sich die Azid-Methode für die Synthese von α -Aminoisobuttersäure enthaltenden Peptiden eignet. Leider sind alle Versuche zur Darstellung von α -Aminoisobuttersäurehydrazid durch Aminolyse der Methyl-, Äthyl- und Benzylester unter verschiedenen Bedingungen mißlungen. Wie GORDON, MILLER und DAY¹⁴⁾ fanden, hängt die Geschwindigkeit der Aminolyse verschiedener Ester von der Art des Säurerestes entscheidend ab. Alkylgruppen am α -C-Atom des Säurerestes erschweren den nucleophilen Angriff des Ammoniak- oder Hydrazinmoleküls. Wahrscheinlich ist der blockierende Einfluß der beiden Methylgruppen der α -Aminoisobuttersäure so groß, daß die Umsetzung von α -Aminoisobuttersäureestern mit Hydrazin verhindert wird. Vorangegangene Reihenversuche zur Darstellung von N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurehydrazid sowie N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäurehydrazid) aus den entsprechenden Estern und Hydrazin unter variierten Bedingungen blieben ebenfalls erfolglos.

Experimenteller Teil

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäure: Die Lösung von 103 g (1 Mol) α -Aminoisobuttersäure in 250 ml 4 n-NaOH wurde während einer Stunde unter Rühren mit 170 g frisch bereitetem Carbobenzoxychlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Entfernung von nicht umgesetztem Carbobenzoxychlorid ausgeäthert. Beim Ansäuern der wäßrigen Lösung schied sich ein Öl ab, das mit Essigester ausgeschüttelt wurde. Die

¹⁴⁾ M. GORDON, J. G. MILLER u. A. R. DAY, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1946 (1948).

Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und der Essigester im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert. Beim Stehen über Nacht oder Reiben mit einem Glasstab kristallisierte das Öl. F. des Rohproduktes: 76–77 °C, Ausbeute: 173–180 g (74–76% d. Th.). Nach einmaligem Umkristallisieren aus Äther/Petroläther schmolzen die erhaltenen Nadeln bei 78 °C¹⁵⁾.

Elementaranalyse:	ber.: C = 60,75%	gef.: C = 60,51%
$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (237,25)	H = 6,37%	H = 6,34%
	N = 5,91%	N = 6,10%

N-Carbobenzoxy-glycin: N-Carbobenzoxyglycin wurde nach BERGMANN und ZERVAS dargestellt. Die Literaturausbeute konnte bei mehreren Ansätzen übertroffen werden, was wahrscheinlich auf das nach A. C. FARTHING dargestellte Carbobenzoxychlorid zurückzuführen ist¹⁶⁾.

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycin: 23,7 g Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäure (0,1 Mol) wurden in 70 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, unter Rühren auf 0 °C abgekühlt und mit 14 ml Triäthylamin und 9,57 ml Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Zu dieser Lösung wurde eine auf 0° abgekühlte Lösung von 7,5 g Glycin und 4 g NaOH in 70 ml Wasser zugegeben. Das Tetrahydrofuran wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur entfernt, die wäßrige Lösung ausgeäthert und mit starker Salzsäure angesäuert. Es schied sich ein Öl ab, das mit Essigester ausgeschüttelt wurde. Die Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und der Essigester im Vakuum entfernt. Es wurde ein farbloses, glasiges Produkt erhalten. Nach wochenlangem Stehen bei Zimmertemperatur kristallisierte es, blieb jedoch immer noch mit Schmierem durchzogen. Ausbeute: 22–24 g (75–81% d. Th.).

α -Aminoisobutyryl-glycin: 1,4 g Carbobenzoxy-dipeptid wurden in 60 ml Methanol gelöst, mit 4 Tropfen Eisessig und 200 mg Palladium-Mohr versetzt. Es wurde 20 Minuten unter starkem Schütteln hydriert, wobei die errechnete Menge H_2 (107 cm³) verbraucht wurde. Das Methanol wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum entfernt. F. 261 bis 263 °C. Ausbeute: 0,744 g (97,4% d. Th.). Das Rohprodukt wurde aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Die tannenbaumförmigen Kristalle schmolzen bei 264 °C (Zers.) Umlagerung zu Nadeln ab 254 °C (Literaturangabe³⁾ F. 264 °C).

Elementaranalyse:	ber.: C = 45,00%	gef.: C = 44,85%
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ (160,17)	H = 7,50%	H = 7,50%
	N = 17,51%	N = 17,68%

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure: 29,4 g Carbobenzoxy-Dipeptid (0,1 Mol) wurden in 200 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, unter Rühren auf 0 °C abgekühlt und mit 14 ml Triäthylamin und 9,57 ml Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Zu dieser Lösung wurde eine zweite auf 0 °C abgekühlte Lösung von 10,3 g α -Aminoisobuttersäure und 4 g Natriumhydroxyd in 200 ml Wasser zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte wie die des Carbobenzoxy-Dipeptids. Beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure schied sich ein Öl ab, das über Nacht kristallisierte. Das Rohprodukt schmolz bei 196–205 °C (Zers.). Ausbeute: 4,2–4,7 g (11,1–12,4% d. Th.). Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert. Es wurden Nadeln vom F. 211 bis 212 °C (Zers.) erhalten.

¹⁵⁾ Sämtliche Schmelzpunkte (Zersetzungspunkte) wurden mit KOFLEB-Mikroschmelzpunkt-Bestimmungsapparat auf BOETIUS-Heiztisch ermittelt.

¹⁶⁾ A. C. FARTHING, J. chem. Soc. (London) 1950, 3215.

Elementaranalyse:	ber.:	C = 56,97%	gef.:	C = 56,95%
$C_{18}H_{25}N_3O_6$ (379,40)		H = 6,64%		H = 6,66%
		N = 11,08%		N = 11,15%

α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure: 1 g Carbobenzoxy-Tripeptid wurde in 50 ml Methanol gelöst, mit 4 Tropfen Eisessig und 100 mg Palladium-Mohr versetzt. Es wurde 1 Stunde unter Schütteln hydriert, wobei die berechnete Menge H_2 (59,2 cm³) verbraucht wurde. Das Methanol wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur entfernt. F. 180–183 °C (Zers.). Ausbeute: 644 mg (99,6% d. Th.). Das Produkt wurde in 200 ml kochendem Wasser gelöst und mit Aceton bis zur Trübung versetzt. Es schieden sich Kristalle vom F. 182–184 °C (Zers.) ab, die ein Mol Kristallwasser enthielten.

Elementaranalyse:	ber.:	C = 45,60%	gef.:	C = 45,33%
$C_{10}H_{19}N_3O_4 \cdot 1 H_2O$		H = 7,99%		H = 7,93%
(263,49)		N = 15,95%		N = 15,61%

Die Analysenprobe wurde 20 Stunden bei 150° im Ölpumpenvakuum getrocknet.

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycin: 3,79 g des Carbobenzoxy-Tripeptids wurden fein gepulvert mit 1,4 ml Triäthylamin in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran und 20 ml absolutem Äthanol unter Erwärmen in Lösung gebracht, bei 0 °C durch 0,96 ml Chlorameisensäureäthylester ins gemischte Anhydrid verwandelt und dann mit einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 0,75 g Glycin und 0,4 g NaOH in 100 ml Wasser unter Rühren umgesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Es wurde mit 1 n-HCl kongosauer gemacht. Beim Einengen im Vakuum kristallisierten 3,4 bis 3,6 g Carbobenzoxy-Tetrapeptid aus (78–82% d. Th.). F. 188–192 °C (Zers.). Das Produkt kristallisierte aus Wasser in dünnen Plättchen. F. 195–196 °C (Zers.).

Elementaranalyse:	ber.:	C = 55,03%	gef.:	C = 55,02%
$C_{20}H_{28}N_4O_7$ (436,46)		H = 6,47%		H = 6,58%
		N = 12,84%		N = 12,78%

α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycin: 1,0 g Carbobenzoxy-Tetrapeptid wurde in 50 ml Methanol gelöst und mit 4 Tropfen Eisessig und 100 mg Palladium-Mohr versetzt. Unter Schütteln wurde 1 Stunde hydriert, wobei die errechnete Menge H_2 (51,5 cm³) verbraucht wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 690 mg Tetrapeptid (99,5% d. Th.). F. 148–152 °C (Zers.). Aus Wasser—Aceton kristallisierte das Tetrapeptid in Plättchen vom F. 150–153 °C (Zers.).

Elementaranalyse:	ber.:	C = 47,70%	gef.:	C = 47,90%
$C_{12}H_{22}N_4O_5$ (302,33)		H = 7,28%		H = 7,53%
		N = 18,55%		N = 18,58%

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure: 1,75 g Carbobenzoxy-Tetrapeptid (0,004 Mol) wurden in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran und 20 ml absolutem Alkohol unter Erwärmen gelöst, auf –15 °C abgekühlt und mit 0,56 ml Triäthylamin und 0,383 ml Chlorameisensäureäthylester versetzt. Zu dieser Lösung wurde unter starkem Rühren eine zweite, auf –10 °C gekühlte Lösung von 0,412 g α -Aminoisobuttersäure und 0,16 g NaOH in 100 ml Wasser zugegeben. Nach der üblichen Aufarbeitung fiel beim Ansäuern mit 1 n-HCl nichts aus. Es wurde deshalb im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingengt. Nach 4 Tagen hatten sich Kristalle vom F. 180–185 °C (Zers.) abgeschieden. Ausbeute: 110–130 mg (5,3 bis 6,3% d. Th.). Das Rohprodukt wurde aus sehr wenig Wasser umkristallisiert. Es wurden Drusen vom F. 184–186 °C (Zers.) erhalten.

Elementaranalyse:	ber.: C = 55,30%	gef.: C = 55,40%
$C_{24}H_{35}N_5O_8$ (521,56)	H = 6,72%	H = 6,87%
	N = 13,44%	N = 13,36%

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure-benzylester: Zu einer Lösung von 4,36 g Carbobenzoxy-Tetrapeptid (0,01 Mol) in 200 ml destilliertem Methylenchlorid wurden der aus 3,21 g α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid (0,014 Mol) hergestellte freie Benzylester¹⁷⁾ und 1,056 g Dicyclohexylcarbodiimid¹¹⁾ hinzugefügt. Schon nach 'kurzer Zeit schied sich N,N'-Dicyclohexylharnstoff ab. Das Reaktionsgemisch wurde nach 3–4 Tagen aufgearbeitet. Zunächst wurde der Harnstoff abfiltriert. Dann wurde die Lösung mit 1 n-HCl, 1 n-NaHCO₃-Lösung und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es resultierte ein Rückstand, der aus Essigester umkristallisiert wurde. F. 177–179 °C (Zers.). Ausbeute: 4,4–4,7 g Carbobenzoxy-Pentapeptidbenzylester (72 bis 77% d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.: C = 60,90%	gef.: C = 60,98%
$C_{31}H_{41}N_5O_8$ (611,68)	H = 6,72%	H = 6,68%
	N = 11,47%	N = 11,55%

α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure: 1,0 g Carbobenzoxy-Pentapeptidbenzylester wurde in 60 ml Methanol gelöst und mit 4 Tropfen Eisessig und 200 mg Palladium-Mohr versetzt. Unter Schütteln wurde 1 Stunde hydriert, wobei die berechnete Menge H₂ (73,5 cm³) verbraucht wurde. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum bei Zimmertemperatur verblieb ein Kristallpulver, das bei 168–171 °C (Zers.) schmolz. Ausbeute: 618 mg freies Pentapeptid (97,7% d. Th.). Das Rohprodukt wurde aus wenig Wasser und viel Aceton umkristallisiert. F. 172 bis 174 °C (Zers.). Das Pentapeptid kristallisierte mit 1 Mol H₂O.

Elementaranalyse:	ber.: C = 47,45%	gef.: C = 47,67%
$C_{16}H_{31}N_5O_7$ (405,446)	H = 7,71%	H = 7,85%
$(C_{16}H_{29}N_5O_6 [387,43] \cdot 1 H_2O)$	N = 17,28%	N = 17,31%

α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure-benzylesterhydrobromid: 2,04 g Carbobenzoxy-Pentapeptidbenzylester wurden mit 2,54 ml HBr in Eisessig^{13) 18)} versetzt. Die CO₂-Entwicklung war nach etwa 45 Minuten abgeklungen. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur vom größten Teil Eisessig und Benzylbromid befreit und mehrere Male aus absolutem Alkohol/Äther umgefällt. Es wurde ein feinkristallines, stark hygroskopisches Produkt erhalten, das in die Hexapeptid-Synthese eingesetzt wurde.

N-Carbobenzoxy-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure-benzylester: Zu einer Lösung von 0,698 g Carbobenzoxyglycin (0,00334 Mol) in 50 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden das aus 2,04 g Carbobenzoxy-Pentapeptidbenzylester hergestellte Pentapeptidbenzylesterhydrobromid und 1,4 ml Triäthylamin hinzugefügt. Unter kräftigem Rühren wurden zu dieser Lösung, die auf –15 °C abgekühlt worden war, während einer Stunde 0,31 ml reinstes POCl₃¹⁹⁾ in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran zusetztropft. Die Reaktionstemperatur wurde während dieser Zeit auf –15 °C gehalten. Zur Auflösung der ausgeschiedenen Triäthylammoniumsalze und Hy-

¹⁷⁾ H. K. MILLER u. H. WAELSCH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1092 (1952).

¹⁸⁾ D. BEN-ISHAÏ, J. org. Chemistry **19**, 62 (1954); R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **37**, 647 (1954); J. C. SHEEHAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

drolyse noch vorhandener P-Cl-Bindungen wurde mit 10 ml Wasser versetzt und das Tetrahydrofuran im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert. Aus der stark sauren, wäßrigen Lösung schied sich ein Öl ab. Es wurden nochmals 10 ml Wasser zugegeben und das Produkt dreimal mit je 10 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden mit 5proz. Na_2CO_3 -Lösung gewaschen, bis beim Ansäuern der letzten Lösung keine Trübung mehr entstand. Nachdem die Essigester-Lösung neutral gewaschen worden war, wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und der Essigester im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert. Es verblieben 720–760 mg eines zähen, öligen Rückstandes (32 bis 34% d. Th.), der aus Essigester/Petroläther kristallisierte. F. 158–159 °C (Zers.), nach dreimaligem Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther. Das erhaltene Produkt kristallisiert in halbkugelförmigen Drusen an der Gefäßwand.

Elementaranalyse:	ber.: C = 59,30%	gef.: C = 59,03%
$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_9$ (668,73)	H = 6,59%	H = 6,75%
	N = 12,59%	N = 12,84%

Glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure:

500 mg Carbobenzoxy-Hexapeptidbenzylester wurden in 50 ml Methanol gelöst, mit 3 Tropfen Eisessig und 100 mg Palladium-Mohr versetzt und 1 Stunde unter Schütteln hydriert. Die berechnete Menge H_2 (29,2 cm^3) wurde während dieser Zeit verbraucht. Nach dem Abdestillieren des Methanols im Vakuum bei Zimmertemperatur verblieb ein leicht gelblicher, kristalliner Rückstand, der aus wenig Wasser und viel Aceton umkristallisiert wurde. F. 158–163 °C (Zers.). Rohausbeute: 315 mg (94,7% d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.: C = 48,65%	gef.: C = 48,63%
$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_7$ (444,48)	H = 7,21%	H = 7,34%
	N = 18,91%	N = 18,80%

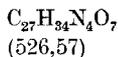
N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycinbenzylester²⁾: 2,37 g Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäure (0,01 Mol), 1,876 g Glycinbenzylesterhydrochlorid und 4,2 ml Triäthylamin wurden in 50 ml absolutem Tetrahydrofuran unter Rühren gelöst, auf –15 °C abgekühlt und im Verlaufe einer Stunde zu dieser Lösung 0,92 ml reinstes POCl_3 in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran zuge tropft. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim Carbobenzoxy-Hexapeptidbenzylester. Der erhaltene kristalline Rückstand wurde aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Es wurden Nadeln vom F. 91–92 °C (Zers.) erhalten. Ausbeute: 3,00–3,20 g (78–83% d. Th.). Bisher wurde N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycinbenzylester nur als Sirup erhalten²⁾.

Elementaranalyse:	ber.: C = 65,60%	gef.: C = 65,24%
$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ (384,42)	H = 6,25%	H = 6,20%
	N = 7,29%	N = 7,48%

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäurebenzylester: 2,94 g Carbobenzoxy-Dipeptid (0,01 Mol), 2,295 g α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid und 4,2 ml Triäthylamin wurden zusammen in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran kräftig gerührt und auf –15 °C abgekühlt. Dazu wurde im Laufe einer Stunde die Lösung von 0,92 ml reinstem POCl_3 in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran zuge tropft. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Der feste Rückstand wurde aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Die erhaltenen Nadeln schmolzen bei 126–127 °C (Zers.). Ausbeute: 2,8–3,2 g (60 bis 74% d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.: C = 63,90%	gef.: C = 63,65%
$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$ (469,52)	H = 6,61%	H = 6,67%
	N = 8,95%	N = 9,06%

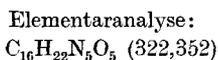
N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycinbenzylester: 0,48g fein zerriebenes Carbobenzoxy-Tripeptid (0,00125 Mol), 0,26 g Glycinbenzylesterhydrochlorid und 0,5 ml Triäthylamin wurden in 50 ml absolutem Tetrahydrofuran und 10 ml absolutem Äthanol kräftig gerührt und auf -15°C abgekühlt. Dazu wurde im Laufe einer Stunde die Lösung von 0,12 ml POCl_3 in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran zuge tropft. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Der feinkristalline Rückstand wurde aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. F. $94-96^{\circ}\text{C}$ (Zers.). Ausbeute: 210–240 mg (32–36% d. Th.).



ber.: N = 10,65% gef.: N = 10,31%
(Mikrokjeldahl)

N-Carbobenzoxy-glycyl-glycin: N-Carbobenzoxy-glycyl-glycin wurde über das gemischte Anhydrid mit Chlorameisensäureäthylester hergestellt. F. 178°C . Ausbeute: 65–68% d. Th.

N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure: 7,2 g N-Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäure (0,032 Mol) wurden in 100 ml Tetrahydrofuran gelöst, unter Rühren auf 0°C abgekühlt und mit 4,3 ml Triäthylamin und 3,08 ml Chlorameisensäureäthylester in das gemischte Anhydrid überführt. Zu dieser Lösung wurde eine auf 0°C abgekühlte Lösung von 3,34 g α -Aminoisobuttersäure und 1,3 g NaOH in 80 ml Wasser zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Bei der Umkristallisation aus einem Gemisch von Essigester und Petroläther wurden Nadeln erhalten. F. $158,5-160^{\circ}\text{C}$ (Zers.). Ausbeute: 0,96 g (9,3% d. Th.).



ber.: C = 59,61% gef.: C = 59,33%
H = 6,88% H = 6,78%
N = 8,69% N = 8,80%

Herrn Prof. Dr. W. LANGENBECK danken wir für sein stetes Interesse bei der Durchführung dieser Arbeit.

Halle, Justus-von-Liebig-Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Bei der Redaktion eingegangen am 1. Dezember 1959.