

Herstellung von Argininpeptiden mit N^7, N^8 -(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-Schutz

Ein Beitrag zur Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit
Arginin und Lysin

Ulrich Hevelke, Josef Föhles, Jean Knott und Helmut Zahn*

Deutsches Wollforschungsinstitut, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen, D-5100 Aachen, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 26. August 1981. Angenommen 22. September 1981)

Synthesis of Arginine Peptides with N^7, N^8 -(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylene)-Protection. Studies on the Reaction of 1,2-Cyclohexanedione with Arginine and Lysine

A method for the synthesis of arginine peptides is described, in which the side chain guanidine function is blocked through reaction with 1,2-cyclohexanedione in borate buffers.

Coupling to the carboxyl group of arginine was achieved by active ester, by dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole¹, and by the mixed anhydride methods². Neither lactam formation nor acylation of the vicinal hydroxyls of the N^7, N^8 -(1,2-dihydroxycyclohex-1,2-ylene) guanidino group was observed.

Removal of the protecting group is strongly influenced by steric factors. Some side reactions observed during modification of peptides and protein fragments with 1,2-cyclohexanedione are also described.

[*Keywords: Activation, lactam-formation, side-reactions; N^7, N^8 -(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylene)-arginine-derivatives and -peptides; Semisynthesis*]

Abkürzungen: Z = Benzyloxycarbonyl, Boc = *t*-Butyloxycarbonyl, DHCH = N^7, N^8 -(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen), HOSu = N-Hydroxy-succinimid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, DMSO = Dimethylsulfoxid, CHD = 1,2-Cyclohexandion, Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, DCHA = Dicyclohexylamin. — Die übrigen Abkürzungen entsprechen dem Vorschlag der IUPAC-IUB-Kommission: Europ. J. Biochem. **53**, 1 (1975).

* Herrn Professor Dr. Hermann Stetter zum 65. Geburtstag gewidmet.

Einleitung

Arginin ist neben Lysin die häufigste Quelle von kationischen Gruppen in Proteinen und Enzymen. Kationische Gruppen wie die Guanidgruppe des Arginins bilden in Proteinen oft „Salzbrücken“ mit Carboxylatanionen anderer Seitenketten und sind so wichtig für die Stabilisierung der Tertiärstruktur.

Eine andere wichtige Funktion von Arginin ist die Wechselwirkung mit phosphorylierten Glykolyse-Metaboliten in Enzymen. *Riordan*³ weist Arginin immer dann eine Schlüsselrolle zu, wenn Enzyme auf anionische Substrate wirken.

Eine Vielzahl von Substanzen ist bisher auf ihre Fähigkeit getestet worden, die Guanidgruppe des Arginins selektiv zu verändern, um die Funktion von Arginin in Enzymen, Proteinen und Proteinfasern studieren zu können^{4, 5}.

Hinzu kommt, daß Arginin eine Angriffsstelle beim tryptischen Abbau von Proteinen ist. Eine Blockierung von Arginin führt zu völlig anderen Spaltmustern und ist so außerordentlich wertvoll für die Sequenzaufklärung.

In der Synthese von Peptiden wird eine Reihe von Schutzgruppen auf Sulfonamid- und Urethanbasis zur Blockierung der komplexen Guanidinfunktion benutzt⁶. Die meisten dieser Schutzgruppen werden auch zur Blockierung der N^α -Aminogruppe verwendet. Zur Einführung in die Seitenkette des Arginins sind allerdings drastische Bedingungen erforderlich⁶.

Wünschenswert sind Reagenzien, die unter milden Bedingungen zu einer vollkommenen Blockierung der Guanidinfunktion führen und gleichzeitig selektiv abspaltbar sind.

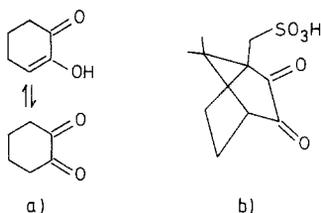
In der Analytik wurden bisher Dicarboxylverbindungen wie bifunktionelle Aldehyde und Ketone zur Blockierung von Arginin verwendet^{4, 5}. Obwohl aus dieser Verbindungsgruppe die α -Dicarboxylverbindungen die genannten Voraussetzungen erfüllen⁵, sind Schutzgruppen auf dieser Basis in der Synthese bisher nicht erprobt worden⁷.

Trotz der Erkenntnis, daß auch bei α -Dicarboxylverbindungen für den ersten Reaktionsschritt die unprotonierte Guanidinfunktion erforderlich ist⁸, sind sie die einzigen Reagenzien, mit denen eine Ausschaltung der komplexen Guanidinfunktion bei relativ niedrigen pH -Werten und daher unter milden Bedingungen möglich ist. Der Grund ist die besondere Reaktivität dieser Verbindungsklasse gegenüber Verbindungen mit Harnstoffstruktur⁸. Eine Nutzung dieser Reaktion mit Arginin für die Synthese und Semisynthese von Proteinen konnte bisher nicht erfolgen, weil keine genauen Untersuchungen über die Stabilität der Reaktionsprodukte vorlagen.

Glass et al. haben versucht, Benzyloxycarbonyl-Arginin und Argininmethylester als enzymlabile Schutzgruppen in der Semisynthese von Proteinen zu verwenden⁹⁻¹². Durch Umsetzung von Glyoxal mit solchen Argininderivaten versuchten sie, stabile enzymresistente Verbindungen zu erhalten¹². Eine eindeutige Charakterisierung blockierter Argininderivate gelang jedoch nicht.

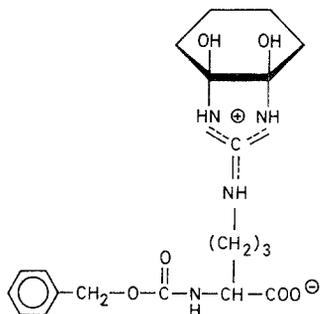
Stabile Reaktionsprodukte mit *cis*-Glykolstruktur wurden zuerst (Formelschema 1 a) bei der Umsetzung des cyclischen 1,2-Cyclohexandions¹³ und der bicyclischen Campherchinonsulfonsäure¹⁴ (Bild 1 b) isoliert.

Formelschema 1



Die Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit Arginin, die zu *N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-Arginin (*DHCH*-Arginin, Formelschema 2) führt, ist die zur Zeit bestuntersuchte Reaktion dieser Art^{8, 13}.

Formelschema 2



Unser Ziel war es, zu untersuchen, ob sich Argininverbindungen mit dieser Schutzgruppe in der Synthese und Semisynthese von Proteinen verwenden lassen und unter den Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese stabil sind.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit Arginin

Durch Umsetzung von *Z*-Arginin und *Boc*-Arginin mit 1,2-Cyclohexandion in Gegenwart von Borat-Anionen konnten die Guanidino-geschützten Verbindungen im 10–20 g Maßstab erhalten werden. Das Verhalten der *DHCH*-geschützten Guanidinfunktion bei der Aktivierung der Carboxylgruppe sollte zuerst an einem *p*-Nitrophenylester des *Z*-geschützten Derivates erprobt werden. Setzt man das innere Salz *Z*-Arg(*DHCH*)-OH in Pyridin mit Trifluoressigsäure-*p*-nitrophenylester nach der Methode von *Sakakibara* und *Inukai*¹⁵ um, oder versucht man den *p*-Nitrophenylester durch Reaktion des Hydrochlorids von *Z*-Arg(*DHCH*)OH mit *p*-Nitrophenol in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid herzustellen, so erhält man kein befriedigendes Resultat.

Nach den spektroskopischen Daten wurde nur ein minimaler Umsatz erzielt (IR, ¹H-NMR). Anzeichen für die Bildung eines *N*^δ-Lactams wurden allerdings im ¹H-NMR-Spektrum der Reaktionsprodukte nicht gefunden^{16, 17}.

Ein *N*-Hydroxysuccinimidester konnte dagegen ohne Schwierigkeiten mit *Z*-Arg(*DHCH*)—OH·HCl und *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt werden. Er zersetzte sich während der Dünnschichtchromatographie im verwendeten Laufmittelsystem (siehe Material und Methoden) in die Ausgangskomponenten.

Bodanszky beobachtete bei dem Versuch, einen *p*-Nitrophenylester von *Z*-Arg(NO₂)—OH herzustellen, die Bildung eines *N*^δ-Lactams¹⁸. Um die Cyclisierungstendenz (Lactambildung) der *DHCH*-Derivate zu überprüfen, behandelten wir in einem Experiment *Z*-Arg(*DHCH*)—OH·HCl in Gegenwart des Acylierungskatalysators 4-Dimethylaminopyridin¹⁹ mit Dicyclohexylcarbodiimid (24 h, 40 °C).

Es wurden 20% chloroformlösliches Produkt isoliert, dessen ¹H-NMR-Spektrum sich nur durch ein Singulett bei 3,1 ppm von der Ausgangsverbindung unterscheidet. Dieses Singulett tritt auch bei den Versuchen zur *p*-Nitrophenylesterbildung auf. Das δ-NH-Proton¹⁷, das wegen des induktiven Effekts der Schutzgruppe bei etwas höherem Feld (8,3–8,8 ppm) absorbiert als in *Z*-Arginin, ist dagegen immer gut zu erkennen.

Mit den *DHCH*-Argininderivaten wurden Dipeptide nach drei Verfahren der Peptidsynthese hergestellt (gemischtes Anhydrid², *DCC*/*HOBt*, Aktivester-Methode).

Wegen der Temperaturempfindlichkeit der *DHCH*-Argininderivate¹³ konnte bei der Aufarbeitung der Reaktionsprodukte nicht über 45 °C geheizt werden.

Tabelle 1. Synthetisierte Argininderivate und -peptide mit DHCH-Schutz

Verbindung	$[\alpha]_D^{23}$	Ausbeute (%)
1 Z-Arg(DHCH)—OH	-3,2 ($c = 1$, 50% HOAc)	85
2 Z-Arg(DHCH)—OH · HCl	-8,3 ($c = 1$, DMF)	75
3 Z-Arg(DHCH)—O ⁻ · DCHA ⁺ · HCl	+5,3 ($c = 1$, Methanol)	87
4 H-Arg(DHCH)—OH · · 2 HCl (· 2 CH ₃ COOH)	+8,2 ($c = 1$, Wasser)	98
5 Z-Arg(DHCH)—OSu · HCl	-9,9 ($c = 1$, DMF)	74
6 Boc-Arg(DHCH)—OH	+3,1 ($c = 1$, Methanol)	53
7 Z-Arg(DHCH)-Gly-OBZL · HCl		
a) DCC/HOBt	+6,6 ($c = 1$, CHCl ₃)	77
b) Aktivestermethode	+6,6 ($c = 1$, CHCl ₃)	82
c) gemischtes Anhydrid	+6,3 ($c = 1$, CHCl ₃)	65
8 H-Arg(DHCH)-Gly—OH · HCl	+21,2 ($c = 1$, Wasser)	98
9 Z-Arg(DHCH)-Gly—OBu ^t · HCl		
a) Aktivestermethode	+6,8 ($c = 1$, CHCl ₃)	81
b) DCC/HOBt	+6,8 ($c = 1$, CHCl ₃)	60
10 Z-Glu(OBu ^t)-Arg(DHCH)-Gly—OH	-16,8 ($c = 1$, Methanol)	49

4 nach *Pathy* und *Smith*¹³ hergestellt [H-Arg(DHCH)—OH · HCl] ergibt den Drehwert +6,1 ($c = 1$, Wasser).

In keinem Fall war eine Kristallisation oder Umkristallisieren zu erreichen.

Alle Präparate zersetzen sich oberhalb von 120 °C (Differentialthermoanalyse).

Die erhaltenen Verbindungen waren beständig und luftstabil. Sie wurden durch Elementaranalyse und ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Es werden keine Schmelzpunkte der Verbindungen in Tab. 1 angegeben, da nur Zersetzungsgebiete unter Verfärbung gefunden wurden. Einige Peptide (**5**, **6**, **7**, **9**) wurden zwar beim Erhitzen glasartig oder ölig, die Differentialthermoanalyse zeigte aber eindeutig, daß es sich um Zersetzungen (120 °C) handelte. Einige Verbindungen sind leicht gelblich oder grünlich gefärbt, was auf Spuren von Verunreinigungen (**5**) zurückzuführen ist (HOSu, HOBt). Die nach der Methode der gemischten Anhydride erhaltenen Verbindungen sind farblos.

Die Verbindungen **4** und **8** mit freier α -Aminogruppe sind bei längerer Lagerung über einige Wochen bei Raumtemperatur nicht stabil und zeigen Veränderungen im ¹H-NMR-Spektrum. Schwierigkeiten bereitete teilweise die Charakterisierung der Substanzen durch Elementaranalyse. Die Produkte hielten oft hartnäckig Borat fest, was sich durch Rückstände bei der Verbrennung bemerkbar machte. So konnte das innere Salz Z-Arg(DHCH)—OH, das noch viel Borat festhält, nur durch sein Hydrochlorid (**2**) und das Dicyclohexylammoniumsalz des Hydrochlorids (**3**) charakterisiert werden. Hatte die

entsprechende Verbindung jedoch während der Synthese eine Hydrierung erfahren, wurde in keinem Fall ein Verbrennungsrückstand bei der Elementaranalyse erhalten (**4**, **8**, **10**).

Das Dipeptid **8** wurde in einer Salzkupplung mit *Z*-Glu(*O**Bu*^t)—*O*Su umgesetzt und das Tripeptid **10** als inneres Salz in 49%iger Ausbeute isoliert.

Ein Vergleich dieses Peptids (**10**) mit dem entsprechenden Tripeptid ohne Argininschutz²⁰ sowie der entsprechenden Zwischenstufen untereinander zeigt den Einfluß des hydrophoben Cyclohexylrestes auf das Löslichkeitsverhalten der Argininpeptide:

Die guanidinoblockierten Dipeptide und das Tripeptid **10** sind alle in Chloroform löslich, die ungeschützten Peptide²⁰ dagegen nicht.

Hydrierung der Verbindungen **1**, **7** und **9** in 0,1 *N* HCl in wäßrigem Tetrahydrofuran oder in 60%iger Essigsäure spaltet die *Z*-Gruppe ab, ohne die *DHCH*-Gruppe zu schädigen.

Die Abspaltung der *Z*-Gruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig aus **1** zerstört auch die Argininschutzgruppe und führt zur Bildung verschiedener Produkte, die alle keine *Sakaguchi*-Reaktion zeigen.

Bei der Abspaltung der *Boc*-Gruppe aus **6** mit 90%iger Trifluoressigsäure²¹ bleiben 35% der Argininschutzgruppen intakt. Die Ausbeute konnte durch Chemisorptionschromatographie²² an einem Polymeren mit Dihydroxyborylgruppen (siehe Übersichtsartikel²³) bestimmt werden.

Abspaltung der Argininschutzgruppe aus den Dipeptiden **7** und **9** mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(*Tris*)²⁴, Hydroxylamin¹³ und *o*-Phenylendiamin¹² erfolgte glatt. Quantitativer Verlauf der Reaktion konnte jedoch erst nach längerer Abspaltdauer erzielt werden als empfohlen^{12, 13, 24}. Bei Peptid-Benzylestern und Methylestern tritt bei der Abspaltung mit Hydroxylamin fast quantitativ Hydroxamsäurebildung ein, mit *Tris* teilweise Verseifung.

Das Tripeptid **10** konnte jedoch unter den Standardbedingungen mit *Tris* oder Hydroxylamin nicht deblockiert werden. Eine intensive Behandlung mit 0,5 *M* Hydroxylamin bei 40 °C über eine Woche führte zur Abspaltung der Schutzgruppe. Nach Isolierung des Peptids stellten wir jedoch teilweise Zerstörung und Ornithinbildung fest.

Es wird ein stereochemischer Einfluß deutlich, wenn man noch zusätzlich beachtet, daß bei der nachträglichen Modifizierung des guanidino-ungeschützten Peptids *Z*-Glu(*O**Bu*^t)-Arg-Gly—OH²⁰ nach *Pathy* und *Smith*²⁵ auch nach verlängerter Reaktionszeit nur 30—40% blockiertes Produkt isoliert werden können.

Modifizierungs- und Abspaltungsgrad werden anscheinend nicht nur — wie bei der Modifizierung von Proteinen — von der Tertiär-

struktur beeinflußt²⁶, sondern sie sind auch von der direkten stereochemischen Umgebung limitiert.

Sterische Hinderung ist wahrscheinlich auch der Grund für die Modifizierung nur eines Argininrestes aus der Sequenz Arg-Arg, ein Befund, den wir bei der Modifizierung²⁵ des Pentapeptides Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-OMe machten. Patthy und Mitarbeiter³² konnten durch Chromatographie an einem Borgel aus den tryptischen Spaltstücken einer Aldose, die sie mit 1,2-Cyclohexandion modifiziert hatten, ein Peptid mit Arg-Arg-Sequenz isolieren, das ebenfalls nur einfach blockiert war. Obwohl die Häufung der basischen Gruppen zu einer Absenkung des *pK*-Wertes der Guanidinfunktion führt und damit zu einer besseren Reaktion mit dem Diketon⁸, spielt hier die Stereochemie anscheinend eine größere Rolle (siehe auch²⁶).

Ein anderer Hinweis auf eine sterische Hinderung kommt von Sasaki et al.²⁷ Sie fanden, daß bei enger Nachbarschaft von Lysin- und Argininresten nach Blockierung der Guanidgruppe durch 1,2-Cyclohexandion die Reaktivität der ϵ -Aminogruppe gegenüber Trinitrobenzolsulfonsäure stark herabgesetzt ist.

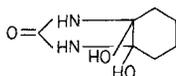
Einige Nebenreaktionen beim Arbeiten mit Dihydroxycyclohexylen-Derivaten wurden gefunden.

So traten teilweise die Farbreaktionen der Voges-Proskauer-Reaktion auf: Guanidgruppen erzeugen in Gegenwart von α -Diketonen, Alkohol und eines Oxidationsmittels (z. B. Luftsauerstoff) eine rötliche Färbung²⁸⁻³⁰. Diese Nebenreaktion wurde beobachtet, wenn bei den Modifizierungsreaktionen in methanolischer Lösung gearbeitet wurde oder Aminosäure- und Peptidester eingesetzt wurden, die unter den Reaktionsbedingungen leicht Alkohol freisetzen (Arg-OMe, Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-OMe).

Ebenso traten rosa Verfärbungen auf, wenn man auf Dünnschichtchromatogrammen DHCH-Verbindungen mit Hypochlorit in *t*-Butanol³¹ besprühte. Diese Farbreaktion eignete sich oft zum Nachweis der DHCH-Verbindungen. Ähnliche Reaktionen wurden auch bei der Aufbewahrung des Peptids 4 in wäßriger Lösung beobachtet, jedoch nie bei Lösungen (auch alkoholischen) von DHCH-Derivaten, die an der α -Aminogruppe geschützt wurden.

Eine andere Nebenreaktion tritt beim Arbeiten in harnstoffhaltigen Puffern ein. Offenkettige α -Diketone reagieren mit Harnstoff in alkalischer Lösung zu Hydantoinen³². Das cyclische 1,2-Cyclohexandion reagierte in harnstoffhaltigen Boratpuffern (16 h) zu einem Derivat, das beim Ansäuern ausfällt und dessen spektrale Daten für die Struktur eines *cis*-4,5-Dihydroxy-cyclohex-4,5-ylen-Imidazolidinon-2 (Formelschema 3) sprechen.

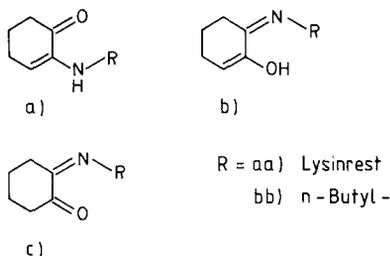
Formelschema 3



Zur Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit Lysin

Die Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins kann in schwach alkalischem Medium zu verschiedenen Produkten führen (Formelschema 4).

Formelschema 4



Das UV-Spektrum von wäßrigen Reaktionslösungen aus Amin und 1,2-Cyclohexandion kann Aufschluß darüber geben, welches der drei angeführten Reaktionsprodukte bevorzugt gebildet wird. Das dem Enamin **a** entsprechende Reaktionsprodukt aus Lysin und dem α -Diketon sollte ein ähnliches Absorptionsmaximum besitzen wie 1-Butylamino-Cyclohexen-2-on-3 (**a**, $R = bb$, s. Formelschema 4). Dieses Produkt, hergestellt nach *Koszlov* und *Kovaleva*³³, besitzt ein Absorptionsmaximum bei 371 nm. Das Produkt **c** besitzt ein Absorptionsmaximum bei 440 nm³⁴. 1,2-Cyclohexandion in der Mono-Enolform absorbiert bei 262 nm³⁵, in der Diketonform³⁵ bei 412 nm mit geringerem Absorptionskoeffizienten.

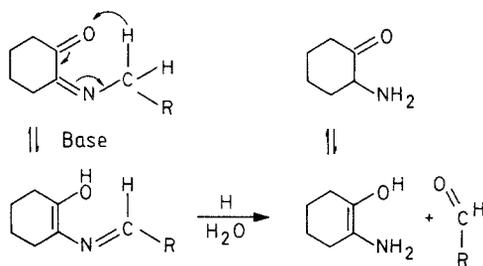
Man sieht, daß der Verlauf der Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit Aminen im UV-Spektrum gut zu verfolgen ist. Unsere Untersuchungen wäßriger Bicarbonatlösungen von Lysin bzw. 1-Butylamin und 1,2-Cyclohexandion zeigten, daß in jedem Fall zuerst das Produkt **c** mit 1-Oxo-2-Iminoform gebildet wird, das dann langsam zum Enamin **a** tautomerisiert.

Geringe Anteile an α,β -ungesättigten *Schiff*-schen Basen (Produkt **b**, λ_{\max} ca. 270 nm), die nach *Monsan* et al.³⁶ mäßig säurestabil sein sollen, wurden nur bei der Reaktion von Lysin mit dem α -Diketon gefunden.

Das Ausmaß der Reaktion von 1,2-Cyclohexandion mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins ist in Boratpuffern wegen der Verringerung der effektiven *CHD*-Konzentration durch Komplexbildung mit Borat-Anionen wesentlich geringer als in Bicarbonatpuffern. Trotzdem fanden wir an verschiedenen lysinhaltigen Peptiden und an der B-Kette von Rinderinsulin nach der Modifizierung mit 1,2-Cyclohexandion

(nach²⁵) einen Lysinverlust bis zu 10% nach saurer Hydrolyse (24 h, 110 °C) und Aminosäureanalyse. Diese hohen Werte sind nur durch eine Transaminierungsreaktion von 1,2-Cyclohexandion mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins zu erklären (Formelschema 5).

Formelschema 5



Schützt man die freie Aminogruppe des Lysins durch Reaktion mit Citraconsäureanhydrid³⁷, so tritt diese Nebenreaktion nicht in Erscheinung.

Zusammenfassende Wertung

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die relative Stabilität der *N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-Schutzgruppe für Arginin (*DHCH*-Gruppe) ausreicht, um sie in der Semisynthese von Proteinen oder in der enzymatischen Synthese³⁸ verwenden zu können.

Ihre Stabilität gegenüber reduktiven Verfahren, die relative Beständigkeit gegenüber Perameisensäureoxidation²⁵, die milden und selektiven Abspaltungsverfahren sowie die Reinigungsmöglichkeit geschützter Argininverbindungen an einem Polymer mit Dihydroxyborylgruppen^{22, 23} sind weitere Vorteile dieser Schutzgruppe.

Die Citraconylierung freier Aminogruppen ist ein ausreichender Schutz, um bei einer Modifizierung von Peptiden und Proteinen mit 1,2-Cyclohexandion eine Transaminierungsreaktion zu verhindern.

Unterschiede in der Reaktivität von 1,2-Cyclohexandion zu anderen α -Dicarbonylen³⁹ sind durch Unterschiede im hydrophoben Charakter der Reagenzien erklärt worden²⁶. Die durch den hydrophoben Cyclohexylrest oft verminderte Löslichkeit geschützter Verbindungen in wäßrigen Medien ist manchmal ein Nachteil in der Semisynthese.

Hier sollen andere cyclische Diketone, wie z. B. Campherchinon-sulfonsäure¹⁴, (Formelschema 1), die in gleicher Weise wie 1,2-Cyclohexandion mit Arginin reagieren, aber zu mehr wasserlöslichen und säurestabilen Derivaten führen, einen Ausweg bieten.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. *R. G. Lawton*, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, für wertvolle Diskussionsbeiträge. Ferner danken wir dem Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Verband der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Material und Methoden

a) 1,2-Cyclohexandion stammte von der Firma Aldrich. Es wurde vor Gebrauch folgendermaßen umkristallisiert: 20 g Diketon wurden in 200 ml Petrolether aufgekocht, die entstandene, milchige Lösung vom gelben Rückstand dekantiert und bei -25°C gelagert.

Die entstandenen weißen Kristalle sind reines Mono-Enol von 1,2-Cyclohexandion (siehe auch³⁵). Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert oder absolutiert. *DMF* wurde über Phthalsäureanhydrid destilliert und über Molekularsieb 3 \AA absolutiert.

Di-*tert*-butyldicarbonat und *o*-Phenylendiamin-Dihydrochlorid wurden von der Fluka AG, Neu-Ulm, geliefert. Dowex-Harze wurden von Serva, Heidelberg, geliefert. Affi-Gel 601 (Borsäuregel) kam von Bio-Rad, München. Dünnschichtchromatographie wurde an DC-Alufolien Kieselgel 60/Kieselgur F 254 und DC-Alufolien Cellulose F 254 (Merck, Darmstadt) vorgenommen.

b) Folgende Laufmittelsysteme wurden vorwiegend benutzt:

1) 2-Butanol/Ameisensäure/Wasser (150:27:23 *v/v*) und

2) *BPAW*, *n*-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (15:10:3:12, *v/v*). Dieses Laufmittel auf Kieselgelfolien (bzw. Cellulosefolien für Verbindung **2** und **7**, Tabelle 1) erwies sich für *DHCH*-Verbindungen, die leicht starkes „Tailing“ zeigen, als geeignet.

Flecken wurden durch Ninhydrin-, Chlor-Tolidin- und *Sakaguchi*-Reaktion sichtbar gemacht³¹.

Boratpuffer wurden mit Borsäure und Natronlauge hergestellt. Ein 0,1 *M* Boratpuffer enthält 0,2 mol Borsäure und 0,1 mol NaOH. Mit HCl wurde auf den entsprechenden *pH*-Wert eingestellt.

Elementaranalysen wurden im Labor Dornis und Kolbe, Mülheim-Ruhr, durchgeführt.

Die optischen Drehungen wurden mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer gemessen.

Aminosäureanalysen wurden mit dem Gerät LC 6000 der Firma Biotronic ausgeführt, Differentialthermoanalysen mit dem Gerät DSC 2 von Perkin-Elmer.

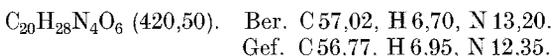
NMR-Spektren wurden mit dem 90 MHz-Gerät EM 390 von Varian aufgenommen (vorzugsweise in *DMSO-d*₆), IR-Spektren mit dem Gerät 467 von Perkin-Elmer und UV-Spektren auf dem Shimadzu UV-200.

Synthesen und Reaktionen

N^α-Benzyloxycarbonyl-*N*⁷,*N*⁸-(1,2-dihydroxycyclohex-1,2-ylen)arginin
[*Z*-Arg(*DHCH*)—OH, **1**]

Z-Arginin⁴⁰ (15,4 g, 50 mmol) wurde in 500 ml Methanol gelöst und zu einer Lösung von 1,2-Cyclohexandion (10 g, 90 mmol) in 1 l 0,2 *M* Na-Boratpuffer

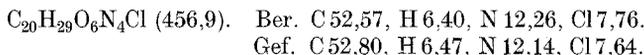
(*pH* 8,6) hinzugefügt und über 12 h gerührt. Anschließend wurde das Methanol im Vak. entfernt und weitere 2 h gerührt. Die Lösung wurde auf 300 ml eingengt und tropfenweise unter starkem Rühren mit 0,5 *N* Salzsäure versetzt bis ein *pH* von 3,5—4,0 erreicht war. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und durch Aufschlämmen und Rühren in 0,05 *N* HCl weitgehend von Borat befreit. Filtrieren und Trocknen ergab **1** als weißes Pulver. Ausbeute: 17 g (85%), $[\alpha]_D^{23} = -3,2^\circ$ ($c = 1,50\%$ HOAc).



(Korrigiert auf B₂O₃ im verbliebenen Rückstand.)

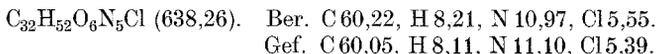
Hydrochlorid-Salz von **1** (**2**)

1 (5 g, 11,9 mmol) wurde in 100 ml 0,1 *N* HCl in wäßrigem Tetrahydrofuran (90%) gelöst und einige min gerührt. Das Salz wurde mit *n*-Hexan ausgefällt. Ausbeute: 4 g (75%), $[\alpha]_D^{23} = -8,3^\circ$ ($c = 1$, DMF).



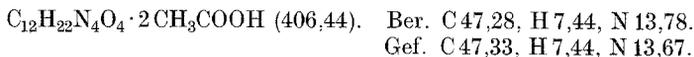
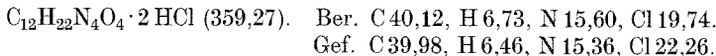
Dicyclohexylammonium-Salz von **2** (**3**)

2 (2 g, 4,4 mmol) wurde in wenig Dimethylformamid gelöst und Dicyclohexylamin (1 ml, 5 mmol) zugegeben. Anschließend wurde mit Essigester verdünnt und das ausgefallene Produkt abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 2,5 g (87%), $[\alpha]_D^{23} = +5,3^\circ$ ($c = 1$, Methanol). **3** ist in Chloroform löslich.



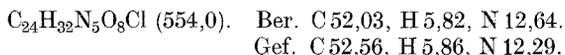
*N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginin-dihydrochlorid (Dihydroacetat) [*H*-Arg(DHCH)—OH)—OH · 2 HCl (· 2 CH₃COOH)] (**4**)

Hydrierung von **1** an Palladium-Aktivkohle in 60% Essigsäure oder in HCl-wäßrigem Tetrahydrofuran lieferte nach Gefriertrocknung **4**. Ausbeute: 98%, $[\alpha]_D^{23} = +8,2^\circ$ ($c = 1$, Wasser).



N-Hydroxysuccinimidester von **2** [*Z*-Arg(DHCH)—OSu · HCl] (**5**)

2 (3,4 g, 7,4 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (1,03 g, 9 mmol) wurden in Dimethylformamid gelöst und Dicyclohexylcarbodiimid (1,8 g, 9 mmol) hinzugegeben. Nach einem Tag Reaktion wurde gekühlt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung im Vak. eingengt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit *n*-Hexan versetzt. Die ausgefallene Substanz wurde abfiltriert, sechs Stunden mit kaltem Isopropanol digeriert, wieder abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 3,1 g (74%), $[\alpha]_D^{23} = -9,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).



4 zersetzt sich im Dünnschichtchromatogramm (siehe Material und Methoden) in die Ausgangskomponenten.

N^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginin
[*Boc*-Arg(*DHCH*)—OH] (**6**)*

a) *Boc*-Arg—OH (inneres Salz)⁴¹ wurde aus Di-*tert*-butyl-dicarbonat⁴² und Arginin (free base) in Dioxan hergestellt. Die Reaktionsmischung wurde eingengt, mit Essigester digeriert und das Festprodukt abfiltriert und getrocknet.

b) *Boc*-Arg—OH (14,1 g, 51,3 mmol) und 1,2-Cyclohexandion (23 g, 105 mmol) wurden in 1 l 0,2 *N* Na-Boratpuffer gelöst (*pH* der Mischung = 8,4). Nach 24 h Reaktion bei 40 °C wird mit 1 *N* HCl auf *pH* 3,5 eingestellt und die gesamte Lösung bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mehrmals mit Ether digeriert, abfiltriert und in *n*-Butanol aufgeschlämmt. Es wird abfiltriert, 3mal mit Wasser gewaschen und zur Trockene eingedampft. Das erhaltene Öl wird 3mal mit kaltem Wasser digeriert und das Wasser dekantiert. Das Öl wird mehrmals in Tetrahydrofuran gelöst und wieder eingedampft, bis ein leicht gelblicher Feststoff entsteht. Dieser wird mit Ether behandelt, abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 10,5 g (53%), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +3,1^{\circ}$ (*c* = 1, Methanol).

Das Produkt hält noch Borat fest.

Die Elementaranalyse läßt sich weder mit dem inneren Salz noch mit dem Hydrochlorid oder Hydrat (siehe auch⁴³) vereinbaren.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt jedoch das gewünschte Produkt.

N^α-Benzyloxycarbonyl-*N*⁷,*N*⁸-(1,2-dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginyl-glycinbenzylester-hydrochlorid **7**

a) *DCC*/*HOBt*-Methode

Z-Arg(*DHCH*)—OH (**1**, 1,4 g, 3,3 mmol) und HCl·Gly—OBZL⁴⁵ (0,8 g, 4 mmol) werden in Pyridin gelöst und auf —5 °C gekühlt. Hierzu wird eine kalte Lösung von 1-Hydroxybenzotriazol (0,7 g, 5,2 mmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (0,8 g, 3,9 mmol) gegeben. Die Lösung wird 6 h in der Kälte gerührt und anschließend noch weiter 12 h bei Raumtemperatur. Es wird gekühlt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und die Lösung eingengt. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und 3mal mit halbgesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet, konzentriert und in überschüssigen Ether eingetropfelt. Das ausgefallene Pulver wird abfiltriert, getrocknet und eine Stunde mit kaltem Isopropanol digeriert. Ausbeute: 1,54 g (77%), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6,6^{\circ}$ (*c* = 1, CHCl₃).

C₂₉H₃₈O₇N₅Cl (604,12). Ber. C 57,64, H 6,34, N 11,59.

Gef. C 57,89, H 6,36, N 11,36.

b) Aktivester-Methode

Z-Arg(*DHCH*)—OSu·HCl (**5**, 1,2 g, 2,2 mmol) und HCl·Gly-OBZL⁴⁵ (0,57 g, 3,25 mmol) werden in Dimethylformamid gelöst, auf 0 °C gekühlt und *N*-Methylmorpholin hinzugegeben (0,3 ml, 2,64 mmol). Nach 3 h Reaktion wird

* **6** wurde ebenfalls von Rose⁴⁴ durch Reaktion von *Boc*-Arg-OH·HCl mit 1,2-Cyclohexandion im Boratpuffer hergestellt und durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

weiteres *N*-Methylmorpholin zugegeben (0,3 ml, 2,64 mmol) und über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingengt, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und 3mal mit halbgesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet, das Peptid mit *n*-Hexan ausgefällt und getrocknet. Ausbeute: 0,93 g (82%), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6,6^{\circ}$ ($c = 1$, CHCl_3).

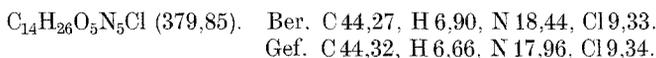
c) Methode der gemischten Anhydride

Ein gemischtes Anhydrid wurde aus *Z*-Arg(*DHCH*)—OH (1, 2,1 g, 4,95 mmol) und Isobutylchloroformat (0,65 ml, 4,95 mmol) in absolutem Dimethylformamid bei -15°C hergestellt. Nach 30 sec wurde $\text{HCl}\cdot\text{Gly}\cdot\text{OBZL}^{45}$ (1,1 g, 5,45 mmol) und *N*-Methylmorpholin (0,6 ml, 5,45 mmol) gelöst in kaltem Dimethylformamid hinzugegeben. Es wurden noch weitere 15 min in der Kälte gerührt und weiterhin, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird eingengt, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und 2mal mit kaltem Wasser gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mit Ether digeriert, abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 1,95 g (65%), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6,6^{\circ}$ ($c = 1$, CHCl_3).

Die nach Methode b und c hergestellten Peptide sind im Chromatogramm und im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identisch mit **7 a**.

*N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginyl-glycinhydrochlorid (8)

Das Dipeptid **7** (1,7 g, 2,81 mmol) wurde in 60 ml 0,1 *N* HCl in Tetrahydrofuran in Gegenwart von Palladium/Aktivkohle hydriert und die Lösung von Zeit zu Zeit mit Wasser verdünnt. Nach beendeter Abspaltung wurde das Tetrahydrofuran im Vak. entfernt und die wäßrige Lösung gefriergetrocknet. Ausbeute: 1,04 g (98 g%), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +21,2^{\circ}$ ($c = 1$, Wasser).



N^α-Benzyloxycarbonyl-*N*⁷,*N*⁸-(1,2-dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginyl-glycin-*tert*-butylester-hydrochlorid (9)

a) Aktivester-Methode

Z-Arg(*DHCH*)—OSu·HCl (**5**) und $\text{CH}_3\text{COOH}\cdot\text{Gly}\cdot\text{OBu}^{t46}$ wurden wie zuvor beschrieben (**7 b**) miteinander umgesetzt und die Reaktionsmischung aufgearbeitet. Zusätzlich wurde die Chloroformphase 1mal mit verdünnter NaHCO_3 -Lösung ausgewaschen. Ausbeute: 81%, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6,8^{\circ}$ ($c = 1$, CHCl_3).



b) *DCC/HOBT*-Methode

Z-Arg(*DHCH*)—OH·HCl (**2**) und $\text{CH}_3\text{COOH}\cdot\text{Gly}\cdot\text{OBu}^{t46}$ wurden wie zuvor beschrieben (**7, a**) miteinander umgesetzt und die Reaktionsmischung aufgearbeitet. Ausbeute: 60%, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6,8^{\circ}$ ($c = 1$, CHCl_3).

9 (nach b) ist im Chromatogramm und im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identisch mit **9, a**.

Benzyloxycarbonyl- γ -*tert*-butoxyglutamyl-*N*⁷,*N*⁸-(1,2-dihydroxycyclohex-1,2-ylen)-arginyl-glycin (**10**)

Das Dipeptid **8** (1,0 g, 2,63 mmol) und NaHCO_3 (0,25 g, 2,85 mmol) werden in Dioxan/Wasser (2:1) gelöst und auf 10°C abgekühlt. Hierzu wird eine

Lösung von *Z*-Glu(*OBu*^t)—*OSu*⁴⁷ (2,9 mmol) in Dioxan/Wasser gegeben und über Nacht kalt gerührt. Dioxan und Wasser wurden im Vak. entfernt und der Rückstand über Nacht bei 30—35 °C mit Essigester digeriert, dann abfiltriert und getrocknet. Der Feststoff wird mit wenig kaltem Wasser versetzt und die Suspension mit Ammoniak auf *pH* 7,5 eingestellt. Beim Verreiben der Suspension²⁰ bildet sich ein leicht gelblicher Feststoff, der abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser und Ether gewaschen und dann getrocknet wird. Ausbeute: 0,85 g (49%), $[\alpha]_D^{23} = -16,8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

Das Produkt enthält „Kristallwasser“ (¹H-NMR). Zur Charakterisierung wurde das Hydrochlorid von **10** durch Lösen in wäßrigem Tetrahydrofuran und Zugabe einer äquimolaren Menge Salzsäure hergestellt.

Die Lösung wurde zur Trockene eingengt und im Vak. getrocknet.

$C_{31}H_{46}N_6O_{10} \cdot HCl$ (699,21). Ber. C 53,25, H 6,77, N 12,02, Cl 5,07.

Gef. C 53,26, H 6,53, N 12,06, Cl 5,12.

Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse mit Thioglykolsäure⁹ (50facher Überschuß/mol Arginin): 1,02 (1) Glu, 1,00 (1) Gly, Spuren Arg (0).

Eine Probe des Peptids wurde auf eine Borgelsäure^{22,23} (Affi-Gel 601, Bio-Rad) aufgetragen, die mit 0,1 *M* Ammoniumacetat in 40% Isopropanol äquilibriert war (1 × 35 cm). Die Substanz bindet am Gel. Dies zeigt, daß die *cis*-Glykol-Struktur während der Synthese erhalten blieb. Elution erfolgte mit 1% Essigsäure in 40% Isopropanol.

Versuche zur Herstellung eines *p*-Nitrophenylesters aus **1** und **2**

1 bzw. **2** wurden in Dimethylformamid/Pyridin oder in Pyridin mit Trifluoressigsäure-*p*-Nitrophenylester behandelt^{11,15}. Nach verschiedenen Reaktionszeiten (1 h—6 h) wurde das Reaktionsgemisch in überschüssigen Ether getropft. Der erhaltene Niederschlag oder das erhaltene Öl wurde in Chloroform/Aceton aufgenommen und erneut in Ether eingetroppt.

Das erhaltene Festprodukt wurde getrocknet und untersucht. Ebenso wurden **2** und *p*-Nitrophenol in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt (*DMF*). Nach 24 h wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und wie oben aufgearbeitet.

Cyclisierungsversuche an **2**

2 (0,45 g, 1 mmol), Dicyclohexylcarbodiimid (0,3 g, 1,5 mmol) und etwas 4-Dimethylaminopyridin¹⁹ wurden 24 h bei 40 °C in 50 ml Pyridin gerührt. Anschließend wurde mit Essigsäure (10%ig) angesäuert, gekühlt, filtriert und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mehrmals mit Essigester behandelt. Die Essigesterextrakte wurden untersucht, enthielten aber vorwiegend den restlichen Dicyclohexylharnstoff und kein Lactam (IR, ¹H-NMR). Der Rückstand wurde jetzt in Chloroform aufgenommen, filtriert, bis auf einige ml eingengt und in Ether eingetroppt. Das ausgefallte gelbe Pulver wurde abfiltriert, getrocknet und untersucht. Die Cyclohexylsignale der *DHCH*-Gruppe waren sowohl im IR-Spektrum (2 860 cm^{-1} , 2 940 cm^{-1}) als auch im ¹H-NMR-Spektrum (1,2—2,0 ppm) unverändert. Zusätzlich zu den Signalen der Ausgangsverbindung trat ein Singulett bei 3,1 ppm auf. Das Triplett des δ -NH-Protons war jedoch vorhanden (8,6 ppm).

Modifizierung von *Z*-Glu(*OBu*^t)-Arg-Gly—OH mit 1,2-Cyclohexandion

Das Peptid²⁰ (55 mg, 0,1 mmol) wurde in 50 ml Methanol gelöst und zu 100 ml einer 0,05 *M* *CHD*-Lösung in 0,2 *N* Na-Boratpuffer gegeben (50facher

Überschuß). Nach 2 h Rühren bei 40 °C wurde auf *pH* 3,0 angesäuert und die Suspension auf ca. 40 ml eingengt. Nachdem 20 ml Methanol zugegeben worden sind, wird einige Zeit gerührt, dann gekühlt und vom ausgefallenen *DHCH*-Peptid (Öl) dekantiert. Das ölige Produkt wird dreimal mit 0,01 *N* HCl digeriert und getrocknet. Durch Lösen in Methanol und Eintropfen in Ether wird ein festes Produkt erhalten. Ausbeute: 26 mg (40%).

Das Produkt enthält noch geringe Mengen an Ausgangsmaterial. Ein sauberes Produkt wurde durch Chromatographie an einem Borsäuregel gewonnen (Bedingungen siehe Synthese von **10**). Das Produkt ist dünnschichtchromatographisch und in der Papierelektrophorese (*pH* 6,5, Pyridin/Essigsäure-Puffer, 0,1 *N* an Borsäure; Anfärbung mit Chlor-Tolidin³¹) identisch mit **10**.

Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse mit Thioglykolsäure¹³ (50facher Überschuß/mol Arginin): 1,01 (1) Glu, 1,00 (1) Gly, Spuren Arg (0).

Abspaltung der DHCH-Gruppe aus den Monomeren 1 und 2 und aus den Dipeptiden 7 und 9

Zur Abspaltung wurde *Tris*²⁴, Hydroxylamin¹³ und *o*-Phenylendiamin^{12,14} verwendet. Es wurde in Dimethylformamid/Wasser-Mischungen gearbeitet (50—70%, je nach Löslichkeit).

Die Abspaltungsreagenzien wurden in Wasser gelöst und am *pH*-Meter auf *pH* 8,0—8,5 eingestellt. Anschließend wurde das Monomer oder Peptid in *DMF* zugegeben und gegebenenfalls bis zur Lösung mit *DMF* verdünnt. Das Abspaltungsreagenz wurde in einem 10fachen Überschuß zu Arginin eingesetzt. Alle Lösungen waren 0,25 *M* an Reagenz. Während der Reaktion betrug die Temperatur 40—45 °C, da sich gezeigt hatte, daß bei Raumtemperatur selbst über mehrere Tage kaum Abspaltung erfolgte. Nach 15—20 h waren die Abspaltungen bei den Monomeren, nach 25—30 h bei den Dipeptiden beendet (DC). Die Lösungen wurden angesäuert, eventuell abfiltriert und i. Vak. eingengt.

Das Reaktionsprodukt aus Abspaltungsreagenz und 1,2-Cyclohexandion fiel entweder teilweise während der Reaktion aus (1,2-Cyclohexandiondioxim) oder wurde in Chloroform extrahiert, nachdem man die Lösungen eingedampft und den Rückstand in Wasser gelöst oder aufgeschlämmt hatte (z. B. 1,2-Cyclohexandiondioxim und 1,2,3,4-Tetrahydrophenazin⁴⁸).

Die wäßrige Phase wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.

Hydroxamsäurebildung bei **7** wurde durch Komplexbildung mit Eisen(III) (Hydroxamsäuretest) und durch Elektrophorese bei *pH* 6,5 nachgewiesen.

Abspaltung der DHCH-Gruppe aus 10 und Isolierung des deblockierten Peptids

a) Es wurde zunächst versucht, die *DHCH*-Gruppe des synthetischen Peptides **10** wie zuvor beschrieben mit *Tris*²⁴ abzuspalten, jedoch konnte dünnschichtchromatographisch kein deblockiertes Tripeptid gefunden werden. Mit 0,5 *M* Hydroxylaminlösung bei 20fachem Reagenzüberschuß (*pH* 8,5, 40 °C) konnte schließlich nach 7 Tagen die Abspaltung beendet werden.

b) Die Reaktionslösung (ca. 400 mg an Peptid) wurde wie zuvor behandelt und mit Chloroform extrahiert. Die wäßrige Phase wurde eingengt mit Methanol/Wasser (1:2) aufgenommen und auf *pH* 3 eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine Dowex-Säule (50 WX 8, 100—200 mesh, H⁺-Form, 2,5 × 15 cm), die mit 1% Essigsäure im gleichen Lösungsmittelgemisch äquilibriert war,

aufgegeben. Nachdem man mit 2—3 Säulenvolumina an Startpuffer gewaschen hatte, wurde mit 1 *M* Pyridin in Methanol/Wasser (1:2) eluiert. Die *Sakaguchi*-positiven Fraktionen wurden gesammelt und eingengt (Öl). Die Aminosäureanalyse zeigt die Bildung von Ornithin sowie Arg, Glu und Gly in nicht stöchiometrischem Verhältnis.

Abspaltung der N^α-Schutzgruppen aus 1 und 6

a) Die *Z*-Gruppe wurde aus **1** durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig (2,4 *N*, 30 min) entfernt. Die Reaktionsmischung wurde eingedampft, mehrmals in 30% Essigsäure gelöst und wieder eingedampft. Durch Chromatographie an einem Borsäuregel wurde auf Anwesenheit von Verbindungen mit *cis*-Glykolstruktur geprüft (Affi-Gel 601, Bio-Rad, 1 × 35 cm, 0,1 m Ammoniumacetat).

25% der Reaktionsmischung wurden gebunden und mit 1% Essigsäure eluiert. Das eluierte Produkt war jedoch chromatographisch (Cellulose-Platten BPAW) nicht identisch mit **4**, außerdem besitzt es einen höheren Extinktionskoeffizienten (A_{254}). Alle Reaktionsprodukte zeigten keine *Sakaguchi*-Reaktion.

b) Die *Boc*-Gruppe wurde aus **6** mit 90% Trifluoressigsäure²¹ abgespalten und wie unter a) aufgearbeitet.

In der Reaktionsmischung wurden 30% einer Verbindung mit *cis*-Glykolstruktur gefunden, die chromatographisch identisch mit **4** war. Außer diesem Produkt wurden keine ninhydrinpositiven Produkte gefunden.

Spektrale Daten von cis-4,5-Dihydroxy-4,5-Cyclohexylen-imidazolidinon-2

IR (cm⁻¹): 3330 (w), ν (OH); 3220—3070 (s), ν (NH); 2940/2860 (m), Cyclohexyl-H; 1740 (s), 1680 (s); 1500 (m), δ (NH); 1210 (m), ν (C—O).

¹H-NMR (ppm): 1,4 (m, 4H); 1,7 (m, 4H); 3,33 (8H₂O); 6,95 (breites s, austauschbar, 4H).

1,2-Cyclohexandiondioxim und Adipinsäure zeigen das gleiche Aufspaltungsmuster der Cyclohexylprotonen, allerdings mit größerer Kopplungskonstante der beiden Multipletts.

UV: keine Absorption (500—240 nm) [0,2 *N* NaHCO₃, Essigsäure (30%)].

Literatur

- 1 König W., Geiger R., Chem. Ber. **103**, 788 (1970).
- 2 Anderson G. W., Zimmermann J. E., Callahan F. M., J. Amer. Chem. Soc. **89**, 5012—5017 (1967).
- 3 Riordan J. F., McElvany K. D., Borders C. L., jr., Science **195**, 884 (1977).
- 4 Means G. E., Feeney R. E., Chemical Modification of Proteins, S. 194. San Francisco: Holden-Day. 1971.
- 5 Riordan J. F., Mol. Cell. Biochem. **26**, 71 (1979).
- 6 Wunsch E., in Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie (Wunsch E., Hrsg.), Bd. 15/1, S. 506—537. 1974.
- 7 Büllesbach E. E., Kontakte (Merck) **1980**, 23.
- 8 Patthy L., Thesz J., Eur. J. Biochem. **105**, 387 (1980).
- 9 Meyers C., Glass J. D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 2193 (1975).
- 10 Glass J. D., Pelzig M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 2739 (1977).
- 11 Glass J. D., Pelzig M., Int. J. Peptide Protein Res. **12**, 75 (1978).
- 12 Glass J. D., Pelzig M., Biochem. Biophys. Res. Commun. **81**, 527 (1978).
- 13 Patthy L., Smith E. L., J. Biol. Chem. **250**, 557 (1975).

- 14 Pande C. S., Pelzig M., Glass J. D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 895 (1980).
- 15 Sakakibara S., Inukai N., Bull. Chem. Soc. Japan **37**, 1231 (1964).
- 16 Bell J. R., Jones J. H., Register D. M., Webb T. C., J. C. S. Perkin I, **1974**, 1961.
- 17 Mayer R., Lancelot G., Hélène C., Spach G., Peptides 1978, Proc. 15th Europ. Pept. Symp. (Siemion I. Z., Kupryszewski G., Hrsg.), S. 323—327. Wrocław: Wrocław University Press. 1979.
- 18 Bodanszky M., Sheehan J. C., Chem. & Ind. **1960**, 1268.
- 19 Höfler G., Steglich W., Vorbrüggen H., Angew. Chem. **90**, 602 (1978).
- 20 Naithani V. K., Föhles J., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 1173 (1978).
- 21 Schnabel E., Klostermeyer H., Berndt H., Annalen **749**, 90 (1971).
- 22 Patthy L., Vara di A., Thesz J., Kovacs K., Eur. J. Biochem. **99**, 309 (1979).
- 23 Carlsöhn H., Hartmann M., Acta Polym. **30**, 420 (1979).
- 24 Samy T. S. A., Kappen L. S., Goldberg I. H., J. Biol. Chem. **255**, 3420 (1980).
- 25 Patthy L., Smith E. L., J. Biol. Chem. **250**, 565 (1975).
- 26 McTigue J. J., Van Etten R. L., Biochim. Biophys. Acta **523**, 422 (1978).
- 27 Sasaki R., Utsumi S., Chiba H., J. Biochem. (Tokyo) **82**, 1173 (1977).
- 28 Voges O., Proskauer B., Z. Hyg. Infekt.-Krankh. **28**, 20 (1898).
- 29 Tuppy H., Mh. Chem. **84**, 342 (1953).
- 30 Roos F., Siest G., Bull. Soc. Lorraine Science **3**, 24 (1965).
- 31 Jäger E., in Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie, Bd. 15/2 (Wünsch E., Hrsg.), 479—480. 1974.
- 32 Fisher H. J., Ekeley J. B., Ronzio A. R., J. Amer. Chem. Soc. **64**, 1434 (1954).
- 33 Koszlov N. S., Kovaleva V. N., J. Org. Chem. USSR **9**, 2271 (1973).
- 34 Liu W.-H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E., Biochem. **7**, 2886 (1968).
- 35 Bakule R., Long F. A., J. Amer. Chem. Soc. **85**, 2309 (1963).
- 36 Monsan P., Puzo G., Mazarguil H., Biochimie **57**, 1281 (1975).
- 37 Atassi M. Z., Habeeb A. F. S. A., in: Methods in Enzymology (Hirs C. H. W., Timasheff S. N., Hrsg.), Bd. XXV (B), S. 546—553 (1972).
- 38 Morihara K., Oka T., Tsuzuki H., Inoye K., Peptides, Proc. 6th Amer. Pept. Symp. (Gross E., Meienhofer J., Hrsg.), S. 617—620. Rockford (Illinois): Pierce Chem. Comp. 1979.
- 39 Rogers T. B., Børresen T., Feeney R. E., Biochem. **17**, 1105 (1978).
- 40 Boissonnas R. A., Guttmann St., Huguenin R. L., Jaquenod P.-A., Sandrin E., Helv. Chim. Acta **41**, 1867 (1958).
- 41 Naithani V. K., Gattner H.-G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **362**, 685 (1981).
- 42 Moroder L., Hallert A., Wünsch E., Keller O., Wersin G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**, 1651 (1976).
- 43 Yamashiro D., Blake J., Li C. H., J. Amer. Chem. Soc. **94**, 2855 (1972).
- 44 Rose K., Laboratory of Molec. Biophysics, Department of Zoology, South Parks Road, Oxford, private Mitteilung.
- 45 Miller H. K., Waelsch H., J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1092 (1952).
- 46 Chimiak A., Kolasa T., Biernat J. F., Z. Chem. **12**, 264 (1972).
- 47 Zahn H., Schnabel E., Z. Naturforsch. **20b**, 650 (1965).
- 48 De Borger L., Anteonis M., Lammens H., Verzelle M., Bull. Soc. Chim. Belg. **73**, 73 (1964).