

Renate Grupe und Hartmut Niedrich

Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden, VII¹⁾

Synthese von Derivaten und Peptiden der DL- α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure (NHPhe) *)

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Berlin-Buch

(Eingegangen am 12. Juli 1966)

Zur Herstellung von Heteropeptiden der DL- α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure werden a) geschützte Aminosäuren am β -Stickstoff der Hydrazinogruppe angeknüpft, b) Benzyloxycarbonyl und tert.-Butyloxycarbonyl als Schutzgruppe eingeführt, c) vom acylierten NHPhe Carbonsäure-Derivate (auch aktivierte) hergestellt und d) weitere Aminosäurereste an das Carboxylende angefügt. Die geringfügige Acylierbarkeit des α -Stickstoffes, die eine Einführung von N^α -Schutzgruppen nicht zuläßt, schränkt die Anwendbarkeit der Peptidknüpfungsmethoden ein.

Unsere Untersuchungen zur Synthese von Heteropeptiden mit Hydrazinosäuren als Fremdbaustein waren bisher auf die Hydrazinoessigsäure (NHGly) beschränkt. Ihr Verhalten unter den Bedingungen der Peptidsynthese wurde eingehend untersucht¹⁻³⁾.

Inzwischen haben Bentley und Morley⁴⁾ das „Hydrazinoessigsäure-Analoge“ des Norophtthalminsäureamids hergestellt. Sie bestätigten unsere Befunde²⁾ über das reaktive Verhalten von NHGly und ergänzten sie durch neue Erkenntnisse speziell über das Verhalten von geschützten Aminoacyl-hydrazinoessigsäureestern gegenüber Alkali und Ammoniak.

Unser Ziel, die Synthese von Hydrazino-Analogen wirksamer Peptide, erfordert den Einsatz von weiteren, besonders optisch aktiven Hydrazinosäuren, die in der Struktur den natürlichen Aminosäuren entsprechen. DL-NHPhe und DL-NHPhe-äthylester-hydrochlorid wurden erstmals von Darapsky synthetisiert⁵⁾. L-NHPhe wurde von uns aus D-Phenylalanin hergestellt⁶⁾.

*) Benutzte Abkürzungen vgl. „Peptide Symposium“ Oxford 1962, ed. by G. T. Young, S. 261, Pergamon Press, Oxford 1963. NHPhe = α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure bzw. -propionyl-, NHGly = Hydrazinoessigsäure bzw. -acetyl-, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, OÄt = Äthylester, OCH₃ = Methylester, OSu = Hydroxysuccinimidester, ONP = *p*-Nitrophenylester, THF = Tetrahydrofuran, DMF = Dimethylformamid.

1) VI. Mittel.: H. Niedrich, Chem. Ber. **98**, 3451 (1965).

2) W. Knobloch und H. Niedrich, J. prakt. Chem. **17**, 273 (1962).

3) H. Niedrich und W. Knobloch, J. prakt. Chem. **17**, 263 (1962).

4) P. H. Bentley und J. S. Morley, J. chem. Soc. [London] **1966** C, 60.

5) A. Darapsky, J. prakt. Chem. **96**, 251 (1917).

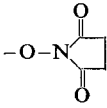
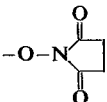
6) H. Niedrich und R. Grupe, J. prakt. Chem. **27**, 108 (1965).

In dieser Arbeit wird am Beispiel von NHPhe die Frage überprüft, wie weit sich die an NHGly-Peptiden gewonnenen Erkenntnisse auf andere Hydrazinosäuren übertragen lassen. Die optimalen Synthesebedingungen sind zunächst an der DL-Verbindung ausgearbeitet worden.

Über ihre Anwendung zur Gewinnung von L-NHPhe-analogen Eledoisinpeptiden wird an anderer Stelle berichtet.

I. Derivate der α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure (NHPhe)

NHPhe-OÄt (**1b**)⁶⁾, der wegen seiner besseren Kristallisationseigenschaften weitaus günstiger als der Methylester darzustellen ist, reagiert mit Kohlensäure-tert.-butylester-[*p*-nitro-phenylester] (BOC-ONP)⁷⁾ bzw. Kohlensäure-benzylester-[*p*-nitro-phenylester] (Z-ONP) zu den acylierten NHPhe-Estern **2a** und **3a**. Dabei wurden in guten Ausbeuten ausschließlich N^β -substituierte Derivate isoliert. Die N^β -Substitution ist durch Vergleich der IR-Spektren mit denen der entsprechenden NHGly-Derivate (charakteristische Banden vgl. I. c.¹⁾) und durch das Ausbleiben der Reaktion mit substituierten Benzaldehyden belegt.

$\begin{array}{c} \text{R}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COX} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$			$\begin{array}{l} \text{1a: R = H; X = OH} \\ \text{1b: R = H; X = OC}_2\text{H}_5 \end{array}$		
R	X	Nr.	Methode	% Ausb.	Schmp.
BOC	OC ₂ H ₅	2a	A) 1b + BOC-ONP B) 1b + BOC-N ₃	73 60	78–80° 78–80°
BOC	OH	2b	A) Verseifung von 2a B) 1a + BOC-N ₃	88 45	184–186° 184–186°
BOC	NH ₂	2c	A) 2a + NH ₃ /Methanol + 1.2.4-Triazol B) ohne Triazol	33 25	158–160° 158–160°
BOC	NH-NH ₂	2d	A) 2a + NH ₂ NH ₂ /Methanol + 1.2.4-Triazol B) ohne Triazol	100 68	125–126° 125–126°
Z	OC ₂ H ₅	3a	1b + Z-ONP	96	nicht krist.
Z	OH	3b	A) Verseifung von 3a B) 1a + Z-Cl	85 55	155–156° 155–156°
Z	NH ₂	3c	A) 3a + NH ₃ /Methanol + 1.2.4-Triazol B) ohne Triazol	37 13	151–152° 151–152°
Z	NH-NH ₂	3d	A) 3a + NH ₂ NH ₂ /Methanol + 1.2.4-Triazol B) ohne Triazol	77 58	144–145° 144–145°
(CH ₃) ₂ C	OC ₂ H ₅	4a	1b + Aceton	85	ca. 55° Sdp. ₂ 130–140°
BOC		5a	2b + HO-Su + DCCI	80	130–132°
Z		5b	3b + HO-Su + DCCI	10	127°

⁷⁾ G. W. Anderson und A. C. McGregor, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

12) R. Schwyzer, M. Feurer und B. Iselin, *Helv. chim. Acta* **38**, 83 (1955).

Die von Bodanszky¹³⁾ eingeführte Methode des schrittweisen Aufbaues von Peptiden mit Hilfe der Nitrophenylester ist auch auf NHPhe-Peptide anwendbar (7a, 8a).

Die Verseifung von 6a bzw. 7a macht auch bei Anwendung eines NaOH-Überschusses im Gegensatz zu den bei der Hydrazinoessigsäure gemachten Erfahrungen^{2,4)} keine Schwierigkeiten. Die von Maclaren¹⁴⁾ gefundene Hydantoinbildung bei Verseifung von Z-AS-Gly-OR (AS = jeder beliebige Aminosäurerest) scheint also in der Hydrazinopeptidreihe ebenfalls nur auf Verbindungen der Struktur Z-AS-NHGly-OR beschränkt zu sein. Eine chymotryptische Verseifung¹⁵⁾ von Peptiden mit endständigem NHPhe gelingt nicht.

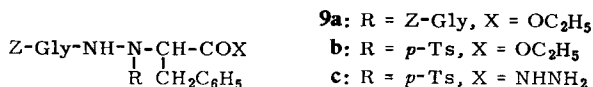
Das Hydrazid 6c wurde aus dem Ester unter Zusatz von 1.2.4-Triazol¹⁰⁾ gewonnen.

III. N^α -Acylierbarkeit von Dipeptiden des NHPhe

Sowohl nach der Carbodiimid-¹⁶⁾ als auch nach der Anhydrid-Methode^{17,18)} konnte am N^α von Z-Gly-NHPhe-OÄt (6a) mit ca. 20% Ausbeute Z-Glycin eingeführt werden (9a).

Auch BOC-NHPhe-OÄt (2a) ließ sich nach der Anhydrid-Methode an N^α zu 24% mit Z-Glycin acylieren. Das dabei erhaltene Produkt ist jedoch instabil.

Die Einführung von N^α -Schutzgruppen in die Dipeptide (mit Z-Cl und BOC-N₃) gelang jedoch nicht. Lediglich mit Tosylchlorid/Triäthylamin in Pyridin¹⁹⁾ konnte zu 77% N^α -(Ts)- N^β -(Z-Gly)-NHPhe-OÄt (9b) erhalten werden.



Die Hydrazinolyse von 9b ergab Ausbeuten von ca. 8% 9c. Beim Versuch der Verseifung von 9b tritt völlige Zersetzung ein. (Zur Reaktion von tosyliertem Hydrazin mit Alkali vgl. l. c.²⁰⁾ und dort zitierte Literatur.)

Die schon unter I. gemachte Beobachtung, daß die N^α -Acylierbarkeit gegenüber NHGly-Derivaten³⁾ vermindert ist, führt hier zu folgenden Schwierigkeiten.

a) Die Acylierbarkeit ist zu gering, um N^α -Schutzgruppen einzuführen, b) sie ist groß genug, um bei DCCI- und Anhydrid-Methode Nebenreaktionen zu bewirken. Als Ausweg bleibt die Anwendung von aktiven Estern bei Hydrazinopeptiden mit freiem N^α .

IV. Die Kondensation N^β -acylierter α -Hydrazino- β -phenyl-propionsäure mit Aminosäureestern

Obwohl N^β -acyliertes NHPhe im eigenen Molekül eine acylierbare funktionelle Gruppe besitzt, kann man es mit DCCI aktivieren und mit Aminosäureestern umsetzen.

¹³⁾ M. Bodanszky und V. duVigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

¹⁴⁾ J. A. Maclaren, Austral. J. Chem. **11**, 345 (1958).

¹⁵⁾ G. Kloss und E. Schröder, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **336**, 248 (1964).

¹⁶⁾ J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

¹⁷⁾ Th. Wieland und M. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951).

¹⁸⁾ R. A. Boissonas, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951).

¹⁹⁾ H. Niedrich, Chem. Ber. **96**, 2774 (1963).

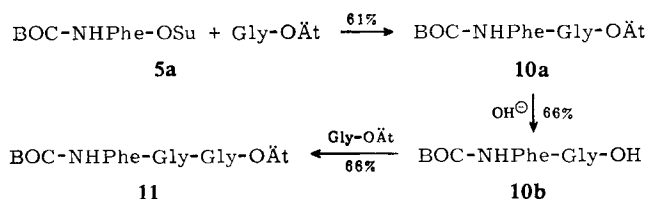
²⁰⁾ L. Caglioti, P. Grasselli und G. Rosini, Tetrahedron Letters [London] **1965**, 4545.

Beim Übergang von einer Kohlensäureester-Substitution $\text{RO}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}_2\text{H}$ an N^β zu einer Acyl-Substitution $\text{CHR}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}_2\text{H}$ fällt die Ausbeute stark ab.

Dieser Befund stimmt mit der bei Hydrazinoessigsäure-Derivaten gemachten Beobachtung überein¹⁾. Die Verminderung der Ausbeute ist nach den Erfahrungen sicherlich auf die unerwünschte N^α -Acylierung zurückzuführen.

Weitaus günstiger ist der Einsatz des unter I. beschriebenen Hydroxysuccinimidesters, mit dem die Darstellung von BOC-DL-NHPhe-Gly-OÄt (**10a**), BOC-DL-NHPhe-L-Leu-OCH₃, BOC-DL-NHPhe-L-Ile sowie BOC-DL-NHPhe-L-Ile-Gly-L-Leu-L-Met-NH₂ in nahezu quantitativen Ausbeuten gelingt. Es handelt sich dabei allerdings um ein Gemisch der Diastereomeren.

Die Anknüpfung weiterer Aminosäureester am Carboxylende mit DCCI ist grundsätzlich möglich:



Für zuverlässige technische Mitarbeit danken wir Herrn *B. Baeck* und Frau *H. Peter*. Die Mikroanalysen wurden in unserem analytischen Labor durch Frau *U. Kräft* und Frau *N. Smirnowa* angefertigt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroheiztisch nach Boetius bestimmt und sind korrigiert. Das Trocknen der Analysenproben erfolgte über P_2O_5 5 Stdn. bei 20–100° und 0.1 Torr. Die Elektrophoresen wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen in 7-proz. Essigsäurelösung (pH 2.4) und in Pyridin/Essigsäure/Wasser (pH 5.6) durchgeführt.

Zur chromatographischen Kontrolle der NHPhe-Derivate benutzten wir Kieselgel- oder Aluminiumoxidplatten und n-Hexan/Essigester/Methanol (10:1:1).

Die Anfärbung der Proben erfolgte entweder mit Ninhydrin oder *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in äthanol. HCl-Lösung. Die „übliche Aufarbeitung“ der Reaktionslösungen wird wie folgt vorgenommen: Nach Entfernen des wäßr. oder mit Wasser mischbaren Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in Essigester, seltener Äther oder Chloroform, aufgenommen, mehrmals mit *n* HCl (bei BOC-Verbindungen mit 10-proz. Citronensäurelösung), *n* NaHCO₃-Lösung, mit Wasser bzw. NaCl-Lösung ausgeschüttelt, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Rotationsverdampfer i. Vak. zur Trockne eingengt.

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (**2a**)

A) Zu 8.5 g (35 mMol) *NHPhe-OÄt*·HCl (**1b**·HCl) in 40 ccm absol. Äther werden unter Eiskühlung und kräftigem Rühren allmählich 5.4 ccm Triäthylamin gefügt. Nach 1 Sde. werden das Triäthylaminhydrochlorid abgesaugt, Äther und überschüss. Triäthylamin i. Vak. abdestilliert. Zu dem öligen Rückstand gibt man 7.5 g Kohlensäure-tert.-butylester-[*p*-nitro-phenylester] (BOC-ONP), wobei sich das Reaktionsgemisch leicht erwärmt. Anschließend wird 5 Stdn. im Wasserbad auf 55° erwärmt, über Nacht bei Raumtemperatur aufbe-

wahrt, in Essigester aufgenommen, vom ungelösten *p*-Nitro-phenol abgesaugt, zur Entfernung des restlichen *p*-Nitro-phenols viermal mit je 30 ccm ca. 7-proz. Ammoniaklösung ausgeschüttelt und weiter wie üblich aufgearbeitet. Der ölige Rückstand wird mit wenig Äther versetzt; beim Einengen i. Vak. kristallisiert die Substanz. Rohausb. 9.5 g (90%). Zur weiteren Synthese kann das Rohprodukt verwendet werden. Aus wenig Äther 7.85 g (73%), Schmp. 78–80°.

B) 2.44 g (10 mMol) von wie unter A) freigesetztem *NHPhe-O-Ät* (1b) werden in 10 ccm Essigester mit 1.57 g (11 mMol) *Azidoameisensäure-tert.-butylester* (BOC-N₃) versetzt und 20 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wird wie üblich aufgearbeitet. Der Rückstand wird in *n*-Hexan aufgenommen, worauf sich nadelförmige Kristalle ausscheiden. Aus Äther 1.8 g (60%), Schmp. 78–80°.

C₁₆H₂₄N₂O₄ (308.4) Ber. C 62.32 H 7.85 N 9.08 Gef. C 62.43 H 7.59 N 9.33

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure (2b)

A) 1.54 g (5 mMol) *BOC-NHPhe-O-Ät* (2a) werden in 20 ccm Methanol unter Rühren während 30 Min. mit 10 ccm *n* NaOH versetzt. Nach einer Stde. wird mit 20 ccm Wasser verdünnt und Methanol i. Vak. abdestilliert. Beim Ansäuern der Lösung mit verd. Salzsäure, zuletzt mit 10-proz. Citronensäurelösung, auf pH 2.5–3 fällt ein kristalliner Niederschlag aus, der abgesaugt, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet wird. Ausb. 1.3 g (88%), Schmp. 184–186° (aus Äthanol).

C₁₄H₂₀N₂O₄ (280.2) Ber. C 59.98 H 7.19 N 10.00 Gef. C 59.92 H 7.07 N 10.15

B) Eine Lösung von 1.80 g (10 mMol) *NHPhe* (1a) in 6 ccm 2*n* NaOH und 10 ccm Dioxan wird mit 1.57 g (11 mMol) *Azidoameisensäure-tert.-butylester* (BOC-N₃) und 0.05 g MgO versetzt und 24 Stdn. bei 35° gerührt. Vom ausgeschiedenen Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat mit 10-proz. Citronensäure auf pH 4 angesäuert. Den kristallinen Niederschlag wäscht man mit Wasser und kristallisiert ihn aus Äthanol um. Dabei wird vom in heißem Äthanol unlöslichen Rückstand abgesaugt. Ausb. 1.3 g (45%), Schmp. 184–186°.

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäureamid (2c): 1.54 g (5 mMol) *BOC-NHPhe-O-Ät* (2a) werden in 10 ccm mit NH₃ gesätt. Methanol gelöst, 100 mg 1.2.4-Triazol hinzugefügt und 2 Tage stehengelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird nochmals in Methanol aufgenommen und abdestilliert. Die Operation wird 3 mal wiederholt. Schließlich wird der Rückstand mit Äther versetzt, bis sich eine kristalline Substanz abscheidet. Aus Methanol Ausb. 0.43 g (33%), Schmp. 158–160°.

C₁₄H₂₁N₃O₃ (279.3) Ber. C 60.12 H 7.58 N 15.05 Gef. C 59.91 H 7.71 N 15.21

N^β-tert.-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-hydrazid (2d): Zu 1.54 g (5 mMol) *BOC-NHPhe-O-Ät* (2a) in 10 ccm absol. Methanol gibt man 100 mg 1.2.4-Triazol sowie 1 ccm 100-proz. *Hydrazinhydrat*. Nach 2 Tagen wird das Lösungsmittel i. Wasserstrahlvak. abdestilliert und der Rückstand mit 10-proz. Citronensäurelösung auf pH 7 gebracht. Beim Verreiben fällt ein kristalliner Niederschlag aus (1.45 g, 100%). Aus Äthanol verbleiben 1.35 g (92%), Schmp. 125–126°.

C₁₄H₂₂N₄O₃ (294.4) Ber. C 57.12 H 7.53 N 19.03 Gef. C 57.03 H 7.55 N 19.31

Kohlensäure-benzylester-[p-nitro-phenylester] (*Z-ONP*) (analog *BOC-ONP* vgl. I. c.⁷⁾): Zu einer Lösung von 33 g *Benzylalkohol* in 125 ccm absol. *Pyridin* gibt man portionsweise bei 0–5° unter Rühren 61 g *Chlorameisensäure-[p-nitro-phenylester]*. Man rührt noch 3 Stdn. bei Raumtemperatur, saugt vom Pyridinhydrochlorid ab, destilliert das Pyridin zum größten Teil ab, fügt 125 ccm Wasser hinzu und schüttelt dreimal mit Äther (200 ccm) aus. Danach

wird die äther. Lösung dreimal mit 200 ccm *n* HCl und je einmal mit gesätt. Na_2CO_3 -Lösung und gesätt. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird der Äther abdestilliert. Ausb. 38.8 g (49%). Aus Methanol (2mal) Schmp. $76-78^\circ$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ (273.2) Ber. C 61.54 H 4.06 Gef. C 61.32 H 4.13

N ^{β} -Benzyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-äthylester (3a): Der freie Ester aus 2.08 g (10 mMol) *NHPhe-O-Ät*·HCl wird analog 2a/A) mit 2.73 g Kohlensäurebenzylester-[*p*-nitro-phenylester] (Z-ONP) umgesetzt. Es wurden 3.2 g (96%) eines Sirups erhalten, der elektrophoretisch einheitlich war. Beim Versuch der Destillation trat Zersetzung ein. Zu den weiteren Umsetzungen wurde das Rohprodukt verwendet.

N ^{β} -Benzyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure (3b)

A) Die Verseifung von 1.71 g Z-*NHPhe-O-Ät* (3a) (ca. 5 mMol) erfolgt wie bei 2b/A). Aus Äthanol/Methanol (2:1) Ausb. 1.35 g (85%), Schmp. $155-156^\circ$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ (314.4) Ber. C 64.96 H 5.77 N 8.91 Gef. C 64.82 H 5.64 N 8.90

B) 4.5 g *NHPhe* (1a) (25 mMol) werden in 12.5 ccm 2*n* NaOH (25 mMol) unter Eiskühlung und Vibromischung portionsweise mit 5.1 g (30 mMol; 4.46 ccm) Chlorameisensäurebenzylester (Z-Cl) und 12.5 ccm 2*n* NaOH innerhalb 45 Min. versetzt, wobei der pH-Wert zwischen 8 und 9 zu halten ist. Anschließend wird noch 30 Min. gerührt, der ausgefallene Niederschlag abgesaugt, das Filtrat mit verd. Salzsäure auf pH 2 angesäuert und der gebildete Niederschlag ebenfalls abgesaugt. Beide Niederschläge werden vereinigt und kräftig zunächst mehrmals mit 0.1 *n* HCl (Aufschlännen im Mörser), dann mit Wasser gewaschen. Die lufttrockene Substanz wird aus reichlich Äthanol/Methanol (2:1) umkristallisiert. Der dabei unlösliche Rückstand wird abgesaugt. Ausb. 4.5 g (55%), Schmp. $155-156^\circ$.

N ^{β} -Benzyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäureamid (3c): 1.0 g (ca. 2.6 mMol) Z-*NHPhe-O-Ät* (3a) wird wie bei 2c/A) umgesetzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird mit wenig *n* HCl auf pH 7 neutralisiert, die Lösung zur Trockne eingengt und der Rückstand mit Äther kristallin gerieben. Aus Methanol 0.3 g (ca. 37%), Schmp. $151-152^\circ$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ (313.3) Ber. C 65.15 H 6.11 N 13.41 Gef. C 65.21 H 6.44 N 13.58

N ^{β} -Benzyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-hydrazid (3d): 2.5 g (ca. 6.7 mMol) Z-*NHPhe-O-Ät* (3a) werden analog 2d/A) angesetzt und aufgearbeitet (Neutralisation mit 0.1 *n* HCl). Aus Methanol 1.7 g (ca. 77%), Schmp. $144-145^\circ$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ (328.4) Ber. C 62.18 H 6.14 N 17.06 Gef. C 62.08 H 6.31 N 17.05

N ^{β} -Isopropyliden-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-äthylester (4a): Der aus 3.03 g (12.5 mMol) *NHPhe-O-Ät*·HCl (1b·HCl) wie bei 2a/A) erhaltene freie Ester wird in 15 ccm Aceton gelöst. Dabei tritt Erwärmung ein. Nach 30 Min. wird das überschüss. Aceton i. Wasserstrahlvak. abdestilliert und der Rückstand an der Ölpumpe destilliert (Sdp.₂ $130-140^\circ$). Ausb. 2.6 g (85%), Schmp. ca. 55° .

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (248.3) Ber. C 67.71 H 8.12 N 11.20 Gef. C 67.51 H 8.10 N 11.08

N ^{β} -tert.-Butyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-[*N*-hydroxy-succinimidester] (5a): 1.4 g BOC-*NHPhe* (2b) (5 mMol) werden in 12 ccm DMF mit 0.58 g *N*-Hydroxy-succinimid und bei 0° unter kräftigem Rühren mit 1.03 g DCCI versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 60 Stdn. bei 0° aufbewahrt, vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat i. Vak. bei 55° eingengt. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und vom evtl. noch ausfallenden Dicyclohexylharnstoff sofort abgesaugt. Beim Stehenlassen über Nacht bei -15° kristallisieren 1.5 g 5a (80%), Schmp. $130-132^\circ$ (aus Methanol).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6$ (377.4) Ber. C 57.29 H 6.14 N 11.13 Gef. C 57.30 H 6.39 N 11.31

***N*^β-Benzyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-[N-hydroxy-succinimidester] (5b):** Eine Lösung von 0.01 Mol *Z-NHPhe* (3b) (3.14 g) und *N-Hydroxy-succinimid* (1.15 g) in 15 ccm THF wird unter Eiskühlung und Rühren mit 2.06 g (0.01 Mol) *DCCI* versetzt. Nach 24 Stdn. Stehenlassen bei 0° wird Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat eingengt und mit n-Hexan festgerieben. Das nichtkristalline Produkt wird mit Äther überschichtet und tropfenweise Methanol hinzugefügt. Dabei scheiden sich Kristalle von *Z-NHPhe-OSu* (5b) ab, die abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert werden. Ausb. 0.4 g (10%), Schmp. 127°.

$C_{21}H_{21}N_3O_6$ (411.7) Ber. C 61.31 H 5.15 N 10.21 Gef. C 61.26 H 5.35 N 10.11

***N*^β-[Benzyloxycarbonyl-glycyl]-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (6a)**

A) *DCCI*-Methode: 1.83 g (7.5 mMol) *NHPhe-O-Ät·HCl* (1b·HCl) werden in 14 ccm THF aufgeschlämmt und unter Rühren und Eiskühlung mit 0.75 g (7.5 mMol) *Triäthylamin* versetzt. Vom Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt und der Niederschlag mit 8 ccm THF gewaschen. Zu den vereinigten Filtraten fügt man 1.53 g (7.5 mMol) *Z-Glycin* und unter Eiskühlung und Rühren 1.52 g (7.5 mMol) *DCCI*. Die Lösung beläßt man über Nacht bei 0°. Nach Abtrennung des Dicyclohexylharnstoffs und üblicher Aufarbeitung wird der erhaltene Rückstand in Äther aufgenommen und der bei -15° auskristallisierte Niederschlag aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 1.65 g (54%), Schmp. 86–88°.

B) Cyanmethylester-Methode: Aus 8.0 g (33 mMol) *NHPhe-O-Ät·HCl* (1b·HCl) wird wie bei 2a/A) der freie Ester hergestellt, in 30 ccm Essigester aufgenommen und mit 6.2 g (25 mMol) *Z-Gly-OCH₂CN* versetzt. Die klare Lösung wird 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt; dann wird wie üblich aufbereitet und weiter wie unter A) verfahren. Ausb. 9.1 g (70%) Schmp. 86–88°.

$C_{21}H_{25}N_3O_5$ (399.5) Ber. C 63.14 H 6.31 N 10.52 Gef. C 63.21 H 6.24 N 10.60

***N*^β-[Benzyloxycarbonyl-glycyl]-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure (6b):** Die Verseifung von 2.0 g (5 mMol) *Z-Gly-NHPhe-O-Ät* (6a) wird wie bei 2b/A) vorgenommen. Ausb. 1.5 g (81%), Schmp. 123–124° (aus Äthanol).

$C_{19}H_{21}N_3O_5$ (371.4) Ber. C 61.44 H 5.70 N 11.31 Gef. C 61.51 H 5.91 N 11.14

***N*^β-[Benzyloxycarbonyl-glycyl]-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-hydrazid (6c):** 3.99 g *Z-Gly-NHPhe-O-Ät* (6a) (10 mMol) werden in 10 ccm absol. Methanol mit 2.5 ccm 100-proz. *Hydrazinhydrat* und ca. 100 mg 1.2.4-Triazol versetzt. Nach 3 Tagen wird die Lösung eingengt, mit Äthanol/Wasser aufgenommen, erneut eingengt und der ölige Rückstand, mit wenig Wasser überschichtet, stehengelassen, wobei er allmählich kristallisiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, vorsichtig mit Wasser digeriert und anschließend aus Wasser vorsichtig umkristallisiert. Ausb. 2 g (52%), Schmp. 135–137°.

$C_{19}H_{23}N_5O_4$ (385.4) Ber. C 59.21 H 6.02 N 18.17 Gef. C 59.49 H 5.86 N 18.11

***N*^β-[Benzyloxycarbonyl-L-alanyl]-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (7a)**

A) Den aus 2.4 g Esterhydrochlorid (10 mMol) nach 2a/A) hergestellten freien Ester 1b und 2.1 g *Z-Alanin* (10 mMol) löst man in 30 ccm Acetonitril und gibt unter Eiskühlung und Rühren 2.46 g (12 mMol) *DCCI* portionsweise hinzu. Die Reaktionslösung wird 24 Stdn. bei 0° aufbewahrt, mit 3 Tropfen Eisessig versetzt, nach 2 Stdn. von Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, wie üblich aufgearbeitet und der Rückstand mit Petroläther kristallin gerieben. Ausb. 2.4 g (60%), Schmp. 94–96° (aus Äthanol).

B) 2.08 g (10 mMol) analog 2a/A) frisch freigesetztes *NHPhe-O-Ät* (1b) in 5 ccm Chloroform und eine Lösung von 3.44 g *Z-Alanin-ONP* (10 mMol) in 6 ccm $CHCl_3$ werden vereinigt, mit 0.03 ccm Eisessig versetzt und 48 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die

Reaktionslösung wird mehrmals mit ca. 7-proz. wäßr. Ammoniak, dann mit *n* HCl und mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und der Rückstand in Äther aufgenommen. Die auskristallisierte Substanz wird aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 3.8 g (92%), Schmp. 94–96°.

C₂₂H₂₇N₃O₅ (413.4) Ber. C 63.91 H 6.58 N 10.16 Gef. C 63.80 H 6.42 N 10.11

N^β-[Benzyloxycarbonyl-*L*-alanyl]-*D,L*-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure (**7b**): Die Verseifung des Esters wird analog **2b/A**) durchgeführt. Bei einem Ansatz von 1.03 g (2.5 mMol) wurden 0.62 g (65%), Schmp. 155° (aus Äthanol/Wasser 1:1), erhalten.

C₂₀H₂₃N₃O₅ (385.4) Ber. C 62.32 H 6.02 N 10.90 Gef. C 62.46 H 6.15 N 10.80

N^β-*L*-Alanyl-*D,L*-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester-hydrobromid (**7c**): 1.03 g (2.5 mMol) *Z*-Ala-NHPhe-OÄt (**7a**) werden in 8.4 ccm absol. Eisessig mit 4.6 ccm ca. 4*n* HBr/Eisessig 40 Min. auf 45° erwärmt. Anschließend wird das Hydrobromid mit absol. Äther ausgefällt. Rohausb. 0.77 g (86%). Aus sehr wenig absol. Äthanol erhält man ein nicht mehr hygroskopisches Hydrobromid. Schmp. 206–211°.

C₁₄H₂₂N₃O₃]Br (360.3) Ber. C 46.67 H 6.16 N 11.66 Gef. C 46.56 H 6.11 N 11.42

N^β-[Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginyll-*L*-alanyl]-*D,L*-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (**8a**): 0.9 g (2.5 mMol) **7c** werden in 4 ccm DMF, mit 0.25 g Triäthylamin und mit einer Lösung von 0.97 g *Z*-Asp(NH₂)-ONP in 9 ccm THF versetzt. Vom ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt und der Niederschlag mit 4 ccm THF gewaschen. Nach Zugabe von 0.015 g Eisessig wird die Lösung 72 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, das Lösungsmittel i. Vak. bei 55° abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mehrmals mit 7-proz. wäßr. Ammoniak, *n* HCl und mit Wasser ausgeschüttelt. Das Produkt, das nach dem Einengen der organischen Phase zurückbleibt, wird aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 0.8 g (61%), Schmp. 186–194°.

C₂₆H₃₃N₅O₇ (527.6) Ber. C 59.19 H 6.30 N 13.28 Gef. C 59.08 H 6.06 N 13.35

N^α,*N*^β-Bis-[benzyloxycarbonyl-glycyl]-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (**9a**)

A) *Anhydrid-Methode*: Zu 1.045 g (5 mMol) *Z*-Gly werden in 4 ccm THF bei –5 bis –10° 0.925 g *Tri-n*-butylamin gegeben, bis pH 7 erreicht ist. Anschließend werden 0.5 g *Chlorameisensäure-äthylester* innerhalb von 10 Min. zugesetzt, noch etwa 20 Min. bei –5° gerührt, dann bei –15° eine vorgekühlte Lösung von 2.0 g *Z*-Gly-NHPhe-OÄt (**6a**) in 12.5 ccm THF hinzugefügt und noch 20 Min. bei –5° gerührt. Man läßt dann 3 Tage im Kühlschrank bei 0° stehen und verreibt den nach der üblichen Aufarbeitung erhaltenen Rückstand mit *n*-Heptan. Das Produkt wird nach mehrtägigem Stehenlassen an der Luft fest. Mehrfache Umkristallisation aus Äthanol liefert 0.5 g (18%) einer elektrophoretisch einheitlichen Verbindung. Schmp. 131°.

B) *Carbodiimid-Methode*: Zu 2.0 g (5 mMol) **6a** und 1.04 g (5 mMol) *Z*-Gly in 30 ccm Acetonitril werden unter Eiskühlung und Rühren 1.23 g (5.1 Mol) *DCCl* hinzugefügt. Man läßt 20 Stdn. bei 0° stehen, saugt vom Dicyclohexylharnstoff ab und arbeitet wie üblich auf. Der Rückstand wird mit Petroläther halbfest gerieben und mehrfach aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 0.6 g (20%), Schmp. 131°.

C₃₁H₃₄N₄O₈ (590.6) Ber. C 63.04 H 5.80 N 9.49 Gef. C 63.03 H 6.01 N 9.48

N^α-*p*-Tosyl-*N*^β-[benzyloxycarbonyl-glycyl]-*D,L*-α-hydrazino-β-phenyl-propionsäure-äthylester (**9b**): Zu 3.99 g (10 mMol) *Z*-Gly-NHPhe-OÄt (**6a**) in 20 ccm absol. Pyridin werden unter Eiskühlung und Rühren 2.28 g (12 mMol) *p*-Tosylchlorid und 1.66 ccm Triäthylamin gleichzeitig hinzugefügt. Nach 24 Stdn. wird Triäthylaminhydrochlorid abgesaugt und das rötliche

Filtrat wie üblich aufgearbeitet. Nach Lösen des öligen Rückstands in Äther erfolgt im Kühlschrank Kristallisation. Ausb. 4.3 g (77%), Schmp. 105–108° (aus Äthanol).

$C_{28}H_{31}N_3O_7S$ (553.6) Ber. C 60.74 H 5.65 N 7.59 Gef. C 60.92 H 5.78 N 7.79

N^{α} -*p*-Tosyl- N^{β} -[benzyloxycarbonyl-glycyl]-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-hydrazid (9c): 1.2 g 9b (2.9 mMol) werden in 12 ccm absol. Methanol unter Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen werden ca. 100 mg 1.2.4-Triazol und 0.76 ccm 100-proz. Hydrazinhydrat hinzugefügt und 4 Tage bei Raumtemperatur belassen. Danach wird die Lösung i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und wiederum eingengt. Diese Operation wird mehrmals wiederholt. Der ölige Rückstand wird über Nacht halbfest. Beim Verreiben mit sehr wenig Wasser geht der größte Teil der Substanz wieder in Lösung, und es hinterbleibt nur geringer kristalliner Rückstand. Ausb. 0.1 g (9%), Schmp. 190–192° (aus Nitromethan); unlöslich in Äthanol und Essigester.

$C_{26}H_{29}N_5O_6S$ (539.6) Ber. C 57.87 H 5.42 N 12.98 Gef. C 57.88 H 5.30 N 12.88

Aus dem wäßr. Filtrat konnte nach Einengen und Verreiben mit Äther eine weitere Substanz (0.6 g) mit Schmp. 112–114° (nach zweimaliger Umkristallisation aus Äthanol) und einem Stickstoffgehalt von 29.3% isoliert werden.

N^{β} -tert.-Butyloxycarbonyl- N^{α} -[benzyloxycarbonyl-glycyl]- α -hydrazino- β -phenyl-propionsäure-äthylester: Das gemischte Anhydrid aus 2.09 g (10 mMol) Z-Gly und 1.08 g (10 mMol) Chlorameisensäure-äthylester wird analog 9a/A) mit einer vorgekühlten Lösung von 3.08 g (10 mMol) BOC-NHPhe-OÄt (2a) in 25 ccm THF umgesetzt, über Nacht bei 0° aufbewahrt und wie üblich aufgearbeitet. Das mit n-Heptan halbfest geriebene Rohprodukt wurde nach Behandeln mit Äther kristallin. Ausb. 1.2 g (24%) mit Schmp. 114–119°.

$C_{26}H_{33}N_3O_7$ (499.6) Ber. C 62.51 H 6.66 N 8.41 Gef. C 62.78 H 6.53 N 8.49

Beim Umkristallisieren des Rohproduktes aus Äthanol wird eine Substanz mit Schmp. 103–107° erhalten, deren Analysenwerte nicht mehr mit den für N^{β} -BOC- N^{α} -(Z-Gly)-NHPhe-OÄt berechneten übereinstimmen.

Darstellung der N^{β} -tert.-Butyloxycarbonyl-DL- α -hydrazino- β -phenyl-propionyl-amino-säureester

A) *DCCI-Methode*: Zu 5 mMol des Aminosäureesterhydrochlorids in 4 ccm DMF werden unter Rühren und Eiskühlung 5 mMol (0.7 ccm) Triäthylamin gefügt. Vom ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt, mit 2 ccm DMF gewaschen und das Filtrat zu einer Lösung von 5 mMol (1.4 g) BOC-NHPhe (2b) in 10 ccm DMF gegeben (der Einsatz frisch dest. Aminosäureester ist vorteilhafter). Bei 0° und unter kräftigem Rühren werden 5 mMol (1.03 g) DCCI zugesetzt und noch 30 Min. gerührt. Man bewahrt ca. 60 Stdn. bei 0° auf, saugt vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht mit Essigester und engt das Filtrat i. Vak. zur Trockne ein. Der nach der üblichen Aufarbeitung erhaltene Rückstand wird in Äther aufgenommen, über Nacht bei –10° aufbewahrt, von weiteren Fällungen wird abgesaugt, der Äther abdestilliert und der Rückstand mehrmals mit Wasser verrieben. Die so erhaltenen Heterodipeptidester können unter Verlusten aus Äther umkristallisiert werden.

B) *Succinimidester-Methode*: Eine wie unter A) bereite Aminosäureester-Lösung (5 mMol) wird mit einer Lösung von 5 mMol (1.88 g) BOC-NHPhe-OSu (5a) in 10 ccm THF vereinigt, ca. 60 Stdn. bei 20–25° aufbewahrt, auf etwa $\frac{1}{4}$ des Volumens i. Vak. eingengt und mit dem doppelten Volumen Wasser versetzt. Der schmierig ausfallende Heterodipeptidester wird bei mehrmaliger Zugabe von Wasser kristallin gerieben. Ausb. 90–100%.

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-glycin-äthylester (10a): Bei Einsatz des frisch dest. *Glycinesters* betrug die Ausb. nach A) 61 %, nach B) 100 % bei einem 5-mMol-Ansatz. Schmp. 98—100°.

C₁₈H₂₇N₃O₅ (365.4) Ber. C 59.16 H 7.45 N 11.50 Gef. C 59.29 H 7.65 N 11.63

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-leucin-methylester: Nach A) Rohausb. 1.4 g (70 %), nach B) 90 %. Die elektrophoretisch und analytisch reinen Substanzen zeigen einen weiten Schmelzbereich (86—104°), was wahrscheinlich auf das vorliegende Diastereomerengemisch zurückzuführen ist; $[\alpha]_D^{20}$: -8.14° (*c* = 1, Äthanol). Nach mehrfacher Kristallisation aus Äther kann unter erheblichem Substanzverlust ein Isomeres angereichert werden, Schmp. 120—123°, $[\alpha]_D^{20}$: -43.5° (*c* = 1, Äthanol).

C₂₁H₃₃N₃O₅ (407.5) Ber. C 61.89 H 8.16 N 10.32 Gef. C 62.04 H 8.32 N 10.20

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid: 0.467 g (1 mMol) *Ile-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl*²¹⁾, 1 mMol Triäthylamin und 1 mMol *BOC-NHPhe-OSu* (5a) in 4 ccm DMF läßt man 60 Stdn. bei 20—25° stehen. Das geschützte *Heteropentapeptid* wird mit Wasser ausgefällt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 0.62 g (90 %), Schmp. 203—208°, elektrophoretisch rein. Reinigung erfolgt durch Lösen in DMF und Ausfällen mit Wasser.

C₃₃H₅₅N₇O₇S (693.9) Ber. C 57.12 H 7.99 N 14.13 Gef. C 57.07 H 8.27 N 14.00

N^β-[Benzyloxycarbonyl-L-alanyl]-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-L-isoleucin-methylester: Die wie unter A) aus 3.3 mMol bereitete *Ile-OCH₃*-Lösung wird mit einer Lösung von 1.29 g (3.3 mMol) *Z-Ala-NHPhe* (7b) in 6 ccm DMF vereinigt und weiter wie unter A) umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung wird der erhaltene Rückstand mehrmals mit Äther aufgenommen und die Lösung i. Vak. eingengt. Aus Methanol Ausb. 0.35 g (20 %), Schmp. 165—167°.

C₂₇H₃₆N₄O₆ (512.6) Ber. C 63.26 H 7.08 N 10.93 Gef. C 62.96 H 7.21 N 11.13

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-glycin (10b): 1.82 g (5 mMol) *BOC-NHPhe-Gly-OÄt* (10a) in 20 ccm Methanol werden unter Rühren mit einer Lösung von 0.2 g NaOH in 50 ccm Wasser vereinigt. Unter Einhaltung von pH 8—9 wird innerhalb von 2 Stdn. eine Lösung von 0.2 g NaOH in 50 ccm Wasser und 20 ccm Methanol hinzugetropt. Danach wird die Lösung i. Vak. eingengt und mit 10-proz. Citronensäure auf pH 2 angesäuert. Beim Stehenlassen über Nacht fällt ein kristalliner Niederschlag aus, der aus Methanol/Wasser (1:2) umkristallisiert wird. Ausb. 1.1 g (66 %), Schmp. 145—147°.

C₁₆H₂₃N₃O₅ (337.4) Ber. C 56.96 H 6.87 N 12.46 Gef. C 56.81 H 7.04 N 12.56

N^β-*tert.*-Butyloxycarbonyl-DL-α-hydrazino-β-phenyl-propionyl-glycyl-glycin-äthylester (11): 0.82 g (2.5 mMol) *BOC-NHPhe-Gly* (10b) werden in 10 ccm THF zunächst mit 0.26 g (2.5 mMol) frisch dest. *Gly-OÄt* versetzt, dann unter Rühren und Eiskühlung mit 0.52 g *DCCI*. Nach Aufbewahren über Nacht bei 0° und Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs erfolgt die Aufarbeitung wie üblich. Der nach Verdampfen des Essigesters verbliebene Rückstand wird in Äther aufgenommen, woraus bei -15° 0.66 g (66 %) 11 auskristallisieren. Schmp. 90—92°.

C₂₀H₃₀N₄O₆ (422.5) Ber. C 56.86 H 7.16 N 13.26 Gef. C 56.99 H 7.34 N 13.28

²¹⁾ K. Lübke, E. Schröder, R. Schmichen und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. 679, 195 (1964).