

Synthesen von selenhaltigen Peptiden, II¹
 Darstellung des Se-analogen oxydierten Glutathions
 (Se-Se-Glutathion)*

Von

Werner Frank

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
 (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(Der Schriftleitung zugegangen am 10. Juli 1964)

Wie bereits in der I. Mitteilung¹ beschrieben, war das Hauptziel dieser Untersuchungen die Synthese von selenhaltigen Peptiden, die in ihrer Wirkung auf biologische Systeme getestet werden sollten. Deshalb erschien es von besonderem Interesse, die schwefelanalogen Wirkstoffe Seleno-Glutathion und Seleno-Oxytocin herzustellen. Im folgenden wird über 2 Synthesen von Se-Se-Glutathion berichtet.

Im Glutathion ist die Mercaptogruppe gegen Oxydationsmittel und Luftsauerstoff bekanntlich sehr empfindlich. Peptide mit freier SeH-Gruppierung lassen sich praktisch nur bei Arbeiten unter völligem Sauerstoffausschluß erhalten; sie besitzen für das Experimentieren in biologischen Systemen keine Bedeutung. Aus diesem Grunde war das dem oxydierten Glutathion analoge Se-Se-Glutathion das Synthesziel.

Unter den vielen bekannten Glutathionsynthesen²⁻⁴ schien die Phosphorazomethode von Goldschmidt und Jutz³ am besten geeignet zu sein, ein von α -Isomeren freies γ -Glutamyl-Peptid zu erhalten. Die Schwierigkeiten bei der γ -Verknüpfung von Glutamylpeptiden wurden von Weygand⁵ diskutiert.

Von *N*-Benzyloxycarbonyl-*Se*-benzyl-L-selenocysteinyl-glycin-äthylester wurde in 2*n* HBr/Eisessig die Benzyloxycarbonylgruppe abgespalten und der freie Dipeptidester II mit *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl- α -äthylester⁵ (I) auf 2 Wegen zu *N*-Benzyloxycarbonyl- γ -L-glutamyl(α -äthylester)-[*Se*-benzyl-L-selenocysteinyl]-glycin-äthylester (III) kondensiert:

* In den hier gebrauchten Trivialnamen bedeutet „Seleno“- den Ersatz von Schwefel durch Selen. — Verwendete Abkürzungen: Z- = Benzyloxycarbonyl-; -OEt = Äthylester; -OMe = Methylester, TFA = Trifluoracetyl-.

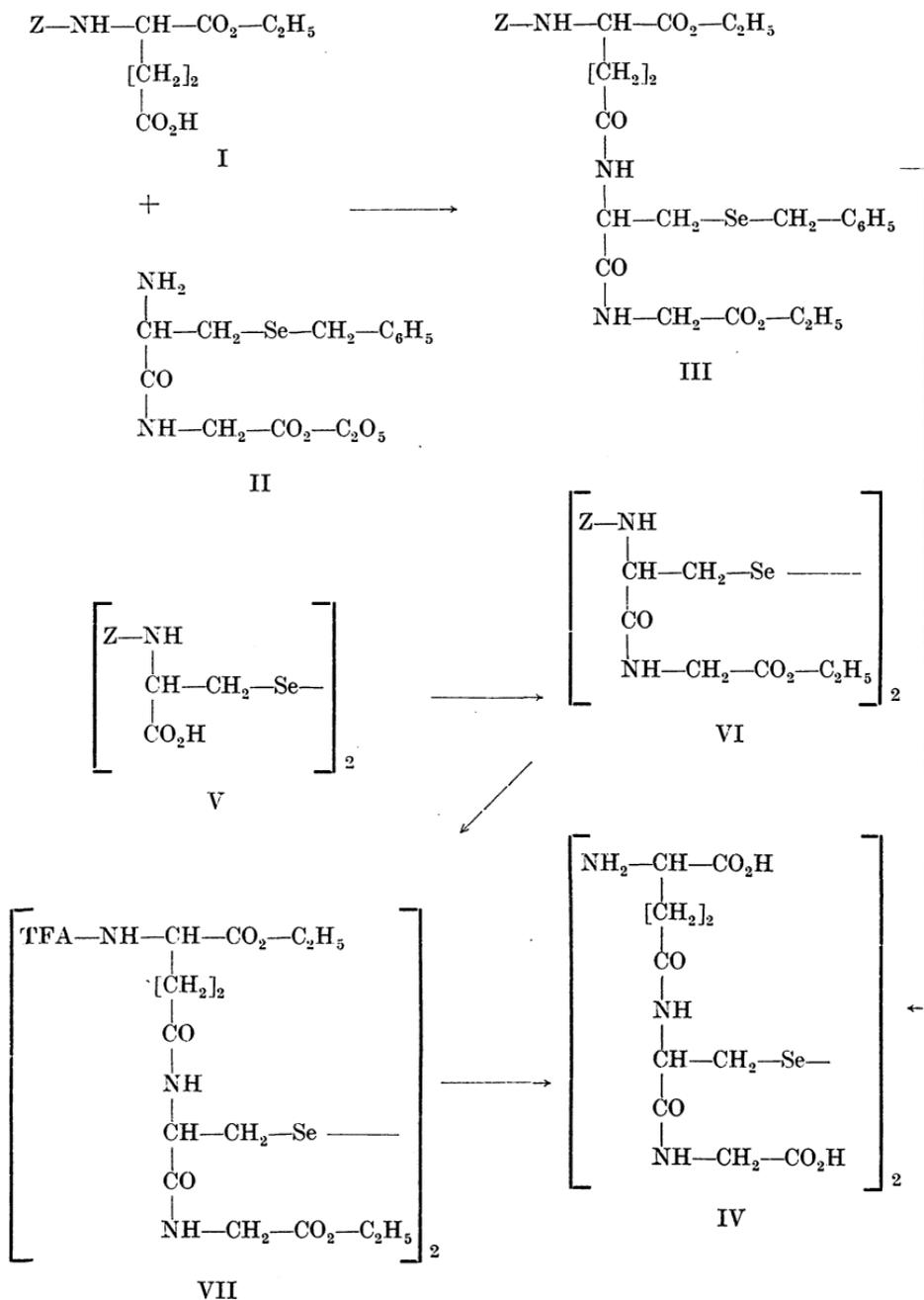
¹ I. Mitteil.: W. Frank, diese Z. **339**, 202 [1964], vorstehend.

² C. R. Harrington u. T. H. Mead, *Biochem. J.* **29**, 1602 [1935]; V. du Vigneaud u. G. L. Miller, *J. biol. Chemistry* **116**, 469 [1936]; B. Hegedus, *Helv. chim. Acta* **31**, 737 [1948].

³ St. Goldschmidt u. Ch. Jutz, *Chem. Ber.* **86**, 1116 [1953].

⁴ F. Weygand u. R. Geiger, *Chem. Ber.* **90**, 634 [1957].

⁵ F. Weygand, *Chem. Ber.* **95**, 7 [1962].



a) I wurde mit Chlorkohlensäure-äthylester in das gemischte Anhydrid überführt und dieses mit dem freien Dipeptid II aminolysiert.

b) II wurde mit POCl_3 in Pyridin in die Phosphorazoverbindung übergeführt und mit I umgesetzt.

Von III wurden die beiden Schutzestergruppen in Dioxan mit der berechneten Menge $1n$ NaOH abhydrolysiert und die Benzyloxycarbonyl- sowie *Se*-Benzyl-Gruppe in flüssigem Ammoniak abgespalten. Nach Verdampfen des Ammoniaks wurde der Rückstand unter Sauerstoffausschluß in Wasser gelöst, mit Eisessig auf pH 6 gebracht und das Selenoglutathion als Quecksilberkomplex gefällt. Dieser wurde abzentrifugiert, gewaschen und in Schwefelwasserstoffwasser unter Sauerstoffausschluß suspendiert. Nach 7 Stdn. wurde das ausgeschiedene Quecksilbersulfid abfiltriert, Luft durch die wäßrige Lösung gesaugt und das Se-Se-Glutathion (IV) nach Einengen der Lösung mit Äthanol gefällt.

Bei der 2. Synthese war *N.N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-diselenocystin (V) die Ausgangsverbindung. Dieses wurde mit Glycin-äthylester mittels Dicyclohexylcarbodiimids zu *N.N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-diselenocystinyl-diglycin-diäthylester (VI) kondensiert. Von VI wurden in $2n$ HBr/Eisessig die Benzyloxycarbonylgruppen abgespalten und das freie Peptid mit *N*-Trifluoracetyl-L-glutaminsäure- α -äthylester- γ -chlorid⁴ zur Verbindung VII umgesetzt. Diese wurde in Dioxan mit der berechneten Menge Natronlauge verseift und das Se-Se-Glutathion (IV) nach Einengen der Lösung durch Zugabe von Äthanol gefällt.

Se-Se-Glutathion fiel als amorphes braunes Pulver an. Es ist sehr labil, nach ganz kurzer Zeit färbt sich die Substanz infolge von Selenabscheidung rot.

Zusammenstellung der in dieser Arbeit synthetisierten selenhaltigen Verbindungen.
X = Benzyl-selenocystein.

Verbindung	Schmp.	Vers.- Beschr. Nr.
L-Diselenocystin	ab 230° (Zers.)	1.
<i>N.N'</i> -Bis-Z-L-diselenocystin (V)	≈ 100°	2.
L-Diselenocystin-(OMe) ₂ · 2HCl	163—164° (Zers.)	3.
<i>N</i> -Z- γ -L-Glu(α -OEt)-L-X-OMe	128—130°	4.
<i>N</i> -Z- γ -L-Glu(α -OEt)-L-X-Gly-OEt (III)	103°	7.
<i>N</i> -Z- α -L-Glu(γ -OMe)-DL-X-Gly-OEt	101—103°	8.
<i>N.N'</i> -Bis-Z-L-diselenocystinyl-(Gly-OEt) ₂ (VI)	206—208°	10.
<i>N.N'</i> -Bis-Z-L-diselenocystinyl-(Gly) ₂	223° (Zers.)	11.
L-Diselenocystinyl-(Gly) ₂	178—180° (Zers.)	12.
Bis-[<i>N</i> -TFA- γ -L-Glu(α -OEt)]-L-diselenocystinyl-(Gly-OEt) ₂ (VII)	214—217°	13.
Bis-[L-Glu]-diselenocystinyl-(Gly) ₂ (IV) (Se-Se-Glutathion)	198—200° (Zers.)	14.

In der Tabelle werden die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen und Peptide zusammengefaßt.

Beschreibung der Versuche

1. *L*-Diselenocystin (Bis-[2-amino-2-carboxy-äthyl]-diselenid): 10,0 g *Se*-Benzyl-*L*-seleno-cystein wurden in 250 ml flüssigem Ammoniak gelöst und mit kleinen Portionen metallischen Natriums versetzt bis zur bleibenden Blaufärbung. Überschüssiges Natrium wurde mit Ammoniumchlorid entfernt und das Ammoniak verdampft. Der Rückstand wurde in 400 ml Wasser gelöst, filtriert und mit konz. Salzsäure angesäuert. Nach Zugabe von 200 mg Hydroxylaminhydrochlorid wurde mit Äther extrahiert und einige Stunden Luft durch die Lösung gesaugt. Dann wurde im Vak. auf ein kleines Volumen eingeeengt, der pH-Wert mit konz. Natronlauge auf 6 gebracht, der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Er wurde wiederum in verd. Salzsäure gelöst, von ausgeschiedenem rotem Selen abfiltriert und pH 6 mit konz. Ammoniak eingestellt. Das Diselenocystin wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und im Vak. über P_2O_5 getrocknet. Ausb. 5,1 g (39% d. Th.). Zur Analyse wurde eine Probe aus Wasser umkristallisiert.

$C_6H_{12}N_2O_4Se_2$ (334,1) Ber. N 8,38 Gef. N 8,25

Kein Schmp., ab 230° Zersetzung unter Aufschäumen.

2. *N,N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-*L*-diselenocystin (V): 5,0 g *L*-Diselenocystin wurden in 30 ml 1*n* NaOH gelöst, in Eiswasser gekühlt und unter kräftigem Rühren im Verlaufe von 25 Min. mit 7,5 ml Benzyloxycarbonylchlorid und 30 ml 2*n* NaOH versetzt. Danach wurde noch 90 Min. ohne Kühlung weitergerührt, 3mal mit je 50 ml Äther extrahiert, mit konz. Salzsäure angesäuert und mit 100 ml Äther ausgeschüttelt. (Bei Anwendung von Essigester konnte die Benzyloxycarbonyl-Verbindung nicht vollständig extrahiert werden.) Die Ätherschicht wurde mit Wasser säurefrei gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vak. abgezogen. Die Verbindung blieb als amorphes Pulver zurück. Ausb. 8,1 g (90% d. Th.). Die Verbindung erweicht bei 60°; unscharfer Schmp. bei 100°.

$C_{22}H_{24}N_2O_8Se_2$ (602,4) Ber. N 4,65 Gef. N 4,61

3. *L*-Diselenocystin-dimethylester-dihydrochlorid: In 15 ml absol. Methanol wurden bei -10° unter kräftigem Rühren 2,2 ml Thionylchlorid und 2,3 g *L*-Diselenocystin eingetragen. Die Suspension wurde 1 Stde. bei 45° gehalten, dann wurden weitere 10 ml Methanol zugefügt und nach 12 Stdn. bei Raumtemp. das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in 20 ml Methanol gelöst und in 200 ml trockenem Äther filtriert. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank wurde der kristalline Niederschlag abgesaugt, mit Äther gut gewaschen und über P_2O_5 im Vak. bei Raumtemp. getrocknet. Ausb. 2,95 g (98% d. Th.).

$C_5H_{16}N_2O_4Se_2 \cdot 2HCl$ (435,1) Ber. N 6,44 Gef. N 6,37

4. *N*-Benzyloxycarbonyl- γ -*L*-glutamyl(α -äthylester)-[*Se*-benzyl-*L*-selenocystein]-methylester: In 50 ml wasserfreies Pyridin, das auf -10° abgekühlt worden war, wurden unter Rühren 0,44 ml Phosphortrichlorid und 3,08 g *Se*-Benzyl-*L*-selenocystein-methylester-hydrochlorid¹ eingetragen. Nach 20 Min. bei Raumtemp. wurden 3,10 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- α -äthylester³ (I) zugegeben und die Lösung 3 Stdn. im Ölbad auf 90° erhitzt. Dann wurde das Pyridin im Vak. abgezogen, der Rückstand in 170 ml Essigester gelöst und mit 3*n* HCl, gesätt. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Die Essigesterlösung wurde über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, der Essigester im Vak. abgezogen und der kristalline Rückstand mehrmals aus verd. Äthanol unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert. Getrocknet über P_2O_5 im Vak. bei 60°. Ausb. 2,2 g (39% d. Th.).

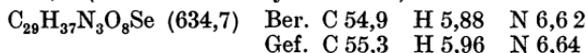
$C_{26}H_{32}N_2O_7Se$ (563,6) Ber. N 4,97 Gef. N 4,84

5. *Se*-Benzyl-*L*-selenocysteinyl-glycin-äthylester-hydrobromid (II-Hydrobromid): 4,61 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*Se*-benzyl-*L*-selenocysteinyl-glycin-äthylester¹ wurden in 50 ml HBr/Eisessig gelöst und nach 1 Stde. bei Raumtemp. mit 500 ml trockenem Äther versetzt. Das Hydrobromid schied sich als Öl ab. Nach Aufbewahren über Nacht im Kühlschrank wurde der Äther abdekantiert, das Hydrobromid mehrmals mit trockenem Äther gewaschen und im Vak. bei Raumtemp. kurze Zeit getrocknet. Das Öl verfestigte sich zu einer amorphen Masse, die ohne weitere Reinigung in 80 ml Tetrahydrofuran, 3,75 ml Triäthylamin und einigen ml Wasser gelöst und sofort weiterverarbeitet wurde.

6. *Se*-Benzyl-*L*-selenocysteinyl-glycin-äthylester (II): 2 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*Se*-benzyl-*L*-selenocysteinyl-glycin-äthylester¹ wurden in 15 ml 2*n* HBr/Eisessig gelöst und, wie unter 5. beschrieben, aufgearbeitet. Das Hydrobromid wurde in 10 ml Wasser gelöst, mit 50 ml Chloroform unterschichtet und die wäßr. Phase mit gesätt. K₂CO₃-Lösung alkalisch gemacht. Dann wurde kräftig durchgeschüttelt, die Chloroformlösung über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und das Chloroform im Vak. abgezogen. Der Dipeptidester blieb als schwach gelb gefärbtes Öl zurück, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ausb. 1,2 g (83% d. Th.).

7. *N*-Benzyloxycarbonyl- γ -*L*-glutamyl(α -äthylester)-[*Se*-benzyl-*L*-selenocysteinyl]-glycin-äthylester (III): a) 3,1 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- α -äthylester (I) wurden in 80 ml dest., wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst, auf -10° abgekühlt und nacheinander unter kräftigem Rühren mit 2,5 ml Triäthylamin und 1,60 ml Chlorkohlensäure-äthylester versetzt. Nach 10 Min. bei -10° wurde die unter 5. beschriebene Lösung des Hydrobromids, ebenfalls auf -10° gekühlt, zugegeben, 10 Min. bei -10° und 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Tetrahydrofuran wurde im Vak. bei 30 $^{\circ}$ abgezogen, der Rückstand in 70 ml Essigester gelöst und mit 3*n* HCl, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Na₂SO₄ wurde der Essigester im Vak. bei 30 $^{\circ}$ abgezogen, der kristalline Rückstand mehrmals aus verd. Äthanol umkristallisiert und im Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 4,2 g (31% d. Th.). Schmp. 103—106 $^{\circ}$.

b) 1,16 g II wurden in 10 ml wasserfreiem Pyridin gelöst, auf 0 $^{\circ}$ abgekühlt und unter kräftigem Rühren mit 0,14 ml Phosphortrichlorid tropfenweise versetzt. Dann wurden 0,93 g I zugegeben und die leicht gefärbte Lösung 3 Stdn. im Ölbad auf 90 $^{\circ}$ erhitzt. Danach wurde das Pyridin im Vak. abgezogen, der braune Rückstand in 50 ml Essigester gelöst und mit 3*n* HCl und gesätt. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die mit Wasser neutral gewaschene Lösung wurde über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, der Essigester im Vak. abgezogen und der schwach gelb gefärbte kristalline Rückstand mehrmals aus verd. Äthanol umkristallisiert. Das Produkt wurde im Vak. über P₂O₅ bei 50 $^{\circ}$ getrocknet. Ausb. 1,60 g (71% d. Th.); Schmp. 103 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25,5}$: $-29,4^{\circ}$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).



8. *N*-Benzyloxycarbonyl- α -*L*-glutamyl(γ -methylester)-[*Se*-benzyl-*DL*-selenocysteinyl]-glycin-äthylester: 3,16 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*Se*-benzyl-*DL*-selenocysteinyl-glycin-äthylester wurden in 35 ml 2*n* HBr/Eisessig gelöst und nach 1 Stde. bei Raumtemp. das Hydrobromid durch Zugabe von 300 ml trockenem Äther ausgefällt. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank wurde der überstehende Äther von dem ausgeschiedenen Öl abdekantiert, mit trockenem Äther mehrmals gewaschen und im Vak. über NaOH getrocknet. Dann wurde das pulvrige, amorphe Hydrobromid in 70 ml Tetrahydrofuran, 3 ml Triäthylamin und einigen ml Wasser gelöst. — 2,40 g *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- γ -methylester wurden in 60 ml Tetrahydrofuran gelöst, auf -10° abgekühlt und unter Rühren 3 ml Triäthylamin und 1,28 ml Chlorkohlensäure-äthylester zugegeben. Nach 10 Min. bei -10° wurde die gleich-

falls gekühlte Lösung des *Se*-Benzyl-DL-selenocysteinyl-glycin-äthylesters zugefügt und weitere 10 Min. bei -10° und 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Tetrahydrofuran wurde im Vak. abgezogen, der Rückstand in 100 ml Essigester gelöst, mit 2n HCl, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigester wurde bis auf ein kleines Volumen abgezogen und der Rückstand mit Petroläther versetzt. Das Dipeptid schied sich über Nacht im Kühlschrank aus. Es wurde abfiltriert, aus verd. Äthanol mehrmals umkristallisiert und im Vak. über P_2O_5 bei 60° getrocknet. Ausb. 2,13 g (50% d. Th.).

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3\text{Se}$ (620,6) Ber. N 6,77 Gef. N 6,73

9. *N*-Benzyloxycarbonyl- γ -L-glutamyl-[*Se*-benzyl-L-selenocysteinyl]-glycin: 1,17 g III wurden in 10 ml gereinigtem Dioxan gelöst und unter Eiskühlung und Rühren tropfenweise mit 5,0 ml 1n NaOH versetzt. Nach 1 Stde. bei Raumtemp. wurde mit 5,0 ml Salzsäure neutralisiert, das Lösungsmittel bis auf einen kleinen Rest im Vak. bei 30° abgezogen und der Rückstand in 20 ml Wasser und 50 ml Essigester gelöst. Nach dem Ansäuern mit konz. Salzsäure wurde kräftig durchgeschüttelt, die Essigesterschicht mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels blieb ein fester Rückstand, der ohne weitere Reinigung der Reduktion unterworfen wurde. Ausb. 0,73 g (68% d. Th.).

10. *N,N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-L-diselenocystinyl-diglycin-diäthylester (VI): 1,59 g V wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst, mit 0,56 g Glycin-äthylester-hydrochlorid und 0,7 ml Triäthylamin versetzt und auf -10° abgekühlt. Dann wurden 0,74 g Dicyclohexylcarbodiimid zugefügt und der gebildete Dicyclohexylharnstoff nach 2 Tagen bei Raumtemp. abfiltriert. Das Dimethylformamid wurde im Vak. abgezogen, der Rückstand in 20 ml Essigester gelöst, mit 3n HCl, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Essigesters im Vak. blieb ein gelbes Öl zurück, das aus verd. Äthanol umkristallisiert wurde; getrocknet im Vak. über P_2O_5 bei 50° . Ausb. 1,40 g (71% d. Th.).

$\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Se}_2$ (772,6) Ber. N 7,25 Gef. N 7,03

11. *N,N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-L-diselenocystinyl-diglycin: 3,2 g VI wurden in 30 ml Äthanol gelöst und unter kräftigem Rühren tropfenweise mit 15 ml 1n NaOH versetzt. Die zunächst gelbe Lösung wurde sofort nach der Zugabe von Natronlauge tiefrot, dann schied sich ein schwarzer Niederschlag (Selen) ab. Nach 45 Min. bei Raumtemp. wurde abfiltriert, der Niederschlag mit Methanol nachgewaschen, das Filtrat mit 15 ml 1n HCl neutralisiert und im Vak. zur Trockene eingedampft. Dabei schied sich rotes Selen ab. Der Rückstand wurde aus verd. Äthanol umkristallisiert, wobei das Peptid als gelbes Pulver anfiel. Ausb. etwa 1 g; die Verbindung hat keinen Schmp., sie sintert ab 223° unter Zersetzung.

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Se}_2$ (716,5) Ber. N 7,82 Gef. N 7,60

12. L-Diselenocystinyl-diglycin: Einige mg *N,N'*-Bis-benzyloxycarbonyl-L-diselenocystinyl-diglycin wurden in 2 ml 2n HBr/Eisessig gelöst und nach 1 Stde. bei Raumtemp. durch Zugabe von trockenem Äther gefällt. Das Hydrobromid wurde mit Äther mehrmals gewaschen, kurz getrocknet und in wenig Wasser gelöst. Mit konz. Ammoniak wurde der pH-Wert auf 6 gebracht und die doppelte Menge Äthanol zugegeben. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank war das Peptid auskristallisiert.

13. Bis-[*N*-Trifluoracetyl- γ -L-glutamyl(α -äthylester)]-L-diselenocystinyl-diglycin-diäthylester (VII): a) 3,2 g VI wurden in 15 ml 2n HBr/Eisessig gelöst und nach 2 Stdn. bei Raumtemp. mit 250 ml trockenem Äther versetzt. Das ausgefallene Hydrobromid wurde mit Äther mehrmals gewaschen und kurze Zeit im Vak. über NaOH getrocknet. Es wurde in 20 ml Chloro-

form und 3,0 ml Triäthylamin gelöst und auf 0° abgekühlt. Dann wurde die bereits beschriebene Lösung von *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure- α -äthylester⁴ in 4 Portionen unter kräftigem Rühren zugegeben und die Lösung 12 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Die Chloroformlösung wurde mit 3*n* HCl, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Chloroforms im Vak. blieb ein fester Rückstand, der aus verd. Äthanol mehrmals umkristallisiert und über P₂O₅ im Vak. bei Raumtemp. getrocknet wurde. Ausb. 2,4 g (55% d. Th.).

C₃₂H₄₆F₆N₆O₁₄Se₂ (1010,8) Ber. N 8,32 Gef. N 8,24

b) 0,40 g VI wurden in 3 ml 2*n* HBr/Eisessig gelöst und nach 2 Stdn. bei Raumtemp. wie bei a) beschrieben aufgearbeitet. Das Hydrobromid wurde in 6 ml Tetrahydrofuran, 0,3 ml Triäthylamin und 1 ml Wasser gelöst. 0,30 g *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure- α -äthylester wurden in 6 ml Tetrahydrofuran gelöst, auf -10° abgekühlt und unter Rühren nacheinander mit 0,2 ml Triäthylamin und 0,16 ml Chlorkohlensäure-äthylester versetzt. Nach 10 Min. bei -10° wurde die Lösung des Hydrobromids zugegeben und nach weiteren 10 Min. bei -10° noch 2 Stdn. bei Raumtemp. weitergerührt, das Tetrahydrofuran im Vak. abgezogen und der Rückstand in Essigester gelöst. Die Lösung wurde mit 3*n* HCl, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Essigesters wurde der Rückstand aus verd. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 0,34 g (62% d. Th.).

14. Bis- $[\gamma$ -*L*-glutamyl]-*L*-diselenocystinyl-diglycin (Se-Se-Glutathion) (IV): a) 0,11 g VII wurden in 3 ml dest. Dioxan gelöst, auf 0° abgekühlt und tropfenweise mit 0,8 ml Natronlauge versetzt. Nach 1 Stde. bei Raumtemp. wurde vom schwarzen Niederschlag (Selen) abfiltriert, das Filtrat durch Zugabe von 0,8 ml 1*n* HCl neutralisiert und das Lösungsmittel im Vak. bei 30° abgezogen. Der Rückstand wurde in wenig warmem Wasser gelöst und mit derselben Menge Äthanol versetzt. Nach Stehenlassen im Kühlschrank wurde der Niederschlag abzentrifugiert, mit wenig Wasser und Äthanol gewaschen und im Vak. über P₂O₅ bei Raumtemp. getrocknet. Es wurden 10 mg eines braunen, amorphen Pulvers erhalten (14% d. Th.); Schmp. 198—200° (Zers.).

C₂₀H₃₂N₆O₁₂Se₂ (706,5) Ber. C 34,0 H 4,56 N 11,9
Gef. C 33,1 H 4,25 N 10,9

b) 0,73 g *N*-Benzyloxycarbonyl- γ -*L*-glutamyl-[*Se*-benzyl-*L*-selenocysteinyl]-glycin (nach 9.) wurden in 150 ml flüssigem Ammoniak gelöst, mit metallischem Natrium in kleinen Portionen bis zur bleibenden Blaufärbung versetzt und mit der äquivalenten Menge Ammoniumchlorid das gebildete Natriumamid neutralisiert. Dann wurde das Ammoniak verdampft, der Rest im Vak. abgezogen und der Rückstand in 50 ml Wasser gelöst. Es wurde filtriert, mit Essigsäure auf pH 6 gebracht und mit einer Lösung von 600 mg HgNO₃ · 2H₂O in 30 ml Wasser und einigen Tropfen Eisessig versetzt. Der ausgeschiedene braune Quecksilberkomplex wurde abfiltriert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und über P₂O₅ bei Raumtemp. getrocknet.

Der Komplex wurde in 75 ml Schwefelwasserstoffwasser 7 Stdn. durch kräftiges Rühren suspendiert, dann vom ausgeschiedenen Quecksilbersulfid abfiltriert und mehrere Stdn. Luft durch die Lösung gesaugt. Nach nochmaligem Filtrieren wurde das Wasser bis auf 1 ml im Vak. bei 30° abgezogen, 2 ml Äthanol zugegeben und einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Peptid wurde abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und über P₂O₅ bei Raumtemp. getrocknet.

Zusammenfassung

Se-Se-Glutathion wurde auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert. Einmal wurde *Se*-Benzyl-*L*-selenocysteinyl-glycin-äthylester mit *N*-Benzyloxycarbonyl-glutamyl- α -äthylester nach der Phosphorazo-

methode bzw. Säurechloridmethode verknüpft und nach Abspaltung der Schutzgruppen, Isolierung des Hg-Komplexes und Oxydation nach Zerlegung mit H₂S das Se-Se-Glutathion isoliert.

Zum anderen wurde es vom Diselenocystin ausgehend durch aufeinanderfolgende Kondensationen mit Glycin-äthylester und *N*-Trifluoracetyl-glutamyl- α -äthylester- γ -chlorid und alkalische Hydrolyse dargestellt.

Summary

Se-Se-glutathione was synthesised by two different routes. *Se*-benzyl-L-selenocysteinyl-glycine-ethyl ester was coupled with *N*-benzyl-oxycarbonyl-glutamyl- α -ethyl ester by the phosphorazo or the acid chloride method. Se-Se-glutathione was isolated after removal of the protective groups, isolation of the Hg complex, decomposition with H₂S and oxidation.

Alternatively, diselenocystine was condensed successively with glycine ethyl ester and *N*-trifluoroacetyl-glutamyl- α -ethyl ester- γ -chloride, followed by alkaline hydrolysis.

Dr. W. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, 74 Tübingen, Spemannstraße 35.
