

FRIEDRICH WEYGAND und KLAUS HUNGER

## Synthese von *p*-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\gamma$ -L-hexaglutamyl-L-glutaminsäure-octabenzylester

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München  
(Eingegangen am 6. Juni 1961)

Als Aminoschutzgruppe bei der Synthese von  $\gamma$ -Glutamyl-peptiden wird der pMZ\*-Rest und als Carboxylschutzgruppe der Benzylrest verwendet. Die Abspaltung des pMZ-Restes mit wasserfreier Trifluoressigsäure bei 0° ist gegenüber der Benzylestergruppe sehr selektiv<sup>1)</sup>. Mit der angegebenen Kombination ist die Bildung von  $\alpha$ -Peptiden oder Gemischen aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Peptiden ausgeschlossen. pMZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ , $\alpha'$ -dibenzylester wurde mit Hilfe von Chlorameisensäure-isobutylester hergestellt. Sonst verwendete man Dicyclohexylcarbodiimid zur Knüpfung der Peptidbindung. Das Verhältnis Benzylestergruppen: pMZ-Rest wurde UV-spektroskopisch kontrolliert.

Pteroyl-heptaglutaminsäure<sup>2)</sup> enthält mit großer Wahrscheinlichkeit monoton  $\gamma$ -Peptidbindungen, wie das für Pteroyl-triglutaminsäure durch Synthese<sup>3,4)</sup> und biologischen Test<sup>4,5)</sup> sichergestellt ist. Wir haben es unternommen, in einwandfreier Weise zunächst ein Derivat der  $\gamma$ -L-Heptaglutaminsäure herzustellen, das die Synthese der Pteroyl-heptaglutaminsäure erlauben sollte. Diese Synthese sollte gleichzeitig die Systematik der Synthese von Glutaminsäure- $\gamma$ -peptiden bereichern, da in letzter Zeit solche Peptide außer dem lange bekannten Glutathion zunehmend an Interesse gewinnen<sup>6)</sup>.

### SCHWIERIGKEITEN BEI DER SYNTHESE VON $\gamma$ -GLUTAMYL-PEPTIDEN

Die  $\gamma$ -Glutamyl-peptid-Synthese mit freier  $\alpha$ -Carboxylgruppe führt nicht zu einheitlichen Produkten, z. B. wurden bei der Umsetzung von Z-Glutaminsäure- $\gamma$ -azid mit Aminosäureestern sowohl  $\gamma$ - als auch  $\alpha$ -Peptide erhalten<sup>7)</sup>. Auch sollte die alkalische Esterverseifung vermieden werden. Schon C. R. HARINGTON und T. H. MEAD<sup>8)</sup> erkannten die Empfindlichkeit der  $\gamma$ -Glutamylbindung gegen Alkalien. Zwar ließ sich Glutathion durch alkalische Esterverseifung und Abspaltung des Trifluoracetyl-

\*1) Abkürzungen: pMZ = *p*-Methoxybenzyloxycarbonyl-; Z = Benzyloxycarbonyl-; B = Benzyl-; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

1) F. WEYGAND und K. HUNGER, Chem. Ber. 95, 1 [1962].

2) J. J. PFIFFNER und Mitarbb., Science [New York] 102, 228 [1948].

3) J. H. MOWAT und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. 70, 1096 [1948].

4) J. H. BOOTHE und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. 70, 1099 [1948].

5) R. B. ANGIER und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. 72, 74 [1950].

6) Ophthalmalsäure, Norophthalmalsäure (S. G. WALEY, Biochem. J. 64, 715 [1956], 67, 172 [1957]);  $\gamma$ -L-Glutaminsäure-di- und -tripeptide aus diverser pflanzlichen Material (A. T. VIRTANEN und A.-M. BERG, Acta chem. scand. 8, 1089 [1954]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 8 [1960]; C. J. MORRIS und J. F. THOMPSON, Arch. Biochem. Biophysics 73, 281 [1958]; M. RINDERKNECHT, D. THOMAS und S. ASLIN, Helv. chim. Acta 41, 1 [1958]); Hypoglycin (C. S. HASALL und K. REYLE, Biochem. J. 60, 334 [1955]).

7) H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 76, 1815 [1954].

8) Biochem. J. 29, 1602 [1935].

restes darstellen<sup>9)</sup>, doch schien uns eine wiederholte Anwendung dieses Schrittes zu riskant. Ferner kann bei alkalischer Esterverseifung leicht Transpeptidierung und zugleich vollständige Racemisierung eintreten<sup>10)</sup>.

So bilden sich bei der Behandlung von Z-Glutamin-estern mit Alkalien und anschließender reduktiver Entfernung des Z-Restes etwa gleiche Mengen Glutamin und Iso-glutamin. Die Reaktion verläuft sicherlich über ein Acylamino-glutarimid (BATTERSBY<sup>10)</sup>). M. LIEFLÄNDER<sup>11)</sup> stellte bei mehreren Z-Glu-Gly- und Z-Glu-Asp-Tripeptiden vollständige Transpeptidierung bei alkalischer Esterverseifung fest.

Die mildeste Methode zur Freilegung von Carboxylgruppen ist die Hydrierung von Benzylestern, weshalb wir uns zur durchgehenden Verwendung von Benzylestern entschlossen. Will man nun die Möglichkeit offenlassen, die Synthese der  $\gamma$ -Glutamyl-peptide am Aminoende oder am  $\gamma$ -Carboxylende nach beiden Richtungen hin fortzusetzen, so werden zwei Schutzgruppen benötigt, von denen die eine z. B. sauer und die andere oxydativ entfernbar sein müßte. Da Vorversuche mit Z-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -phenylhydrazid nicht zu einwandfreien Resultaten führten<sup>12)</sup>, entschieden wir uns für den stufenweisen Aufbau der  $\gamma$ -Glutamyl-peptide vom Aminoende aus, wobei zur Einsparung von Reaktionsschritten ein Derivat der  $\gamma$ -Diglutaminsäure eingesetzt werden sollte.

Da weitere Vorversuche mit Carbobenzoxy- $\alpha$ -benzylester zeigten, daß die Abspaltung des Z-Restes mit wasserfreier Trifluoressigsäure<sup>13)</sup> nur zu einer Ausbeute von maximal 40% an Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester führte, war eine Schutzgruppe zu verwenden, die leichter als der Z-Rest entfernbar ist. Wir wählten den *p*-Methoxybenzyl-oxycarbonyl-Rest, der durch wasserfreie Trifluoressigsäure schon bei 0° in Sekunden abgespalten wird und der leicht über pMZ-Azid einführbar ist<sup>1)</sup>.

Die Kombination pMZ-Rest als Schutzgruppe für die Aminogruppe und Benzylrest zum Schutz der Carboxylgruppe bewährte sich hervorragend.

#### AUSFÜHRUNG DER SYNTHESE

pMZ-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester läßt sich aus L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester, der nach H. SACHS und E. BRAND<sup>14)</sup> aus dem L-Glutaminsäure-dibenzylester durch partielle Verseifung mit Jodwasserstoffsäure leicht erhältlich ist, mit pMZ-Azid in fast 90-proz. Ausbeute gewinnen. Dieses Verfahren ist dem anderen, ebenfalls ausgearbeiteten über pMZ-L-Glutaminsäure, pMZ-L-Glutaminsäure-anhydrid (mit Acetanhydrid in der Kälte dargestellt) und pMZ-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester-dicyclohexylammoniumsalz überlegen. Die Gesamtausbeute betrug nach diesem Verfahren nur 20%, während nach dem zuerst genannten über 30% erreicht wurden, was für den Beginn einer mehrstufigen Synthese nicht ohne Bedeutung ist.

9) F. WEYGAND und R. GEIGER, Chem. Ber. 90, 634 [1957].

10) A. R. BATTERSBY und I. C. ROBINSON, J. chem. Soc. [London] 1955, 259; E. SONDEHEIMER und R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 76, 2467 [1954]; 79, 3767 [1957]; D. W. CLAYTON, G. W. KENNER und R. C. SHEPPARD, J. chem. Soc. [London] 1956, 371; V. BRUCKNER, M. KAJTÁR, J. KOVÁCS, H. NAGY und J. WEIN, Tetrahedron [London] 2, 211 [1958]; P. SCHELLENBERG und J. ULLRICH, Chem. Ber. 92, 1276 [1959].

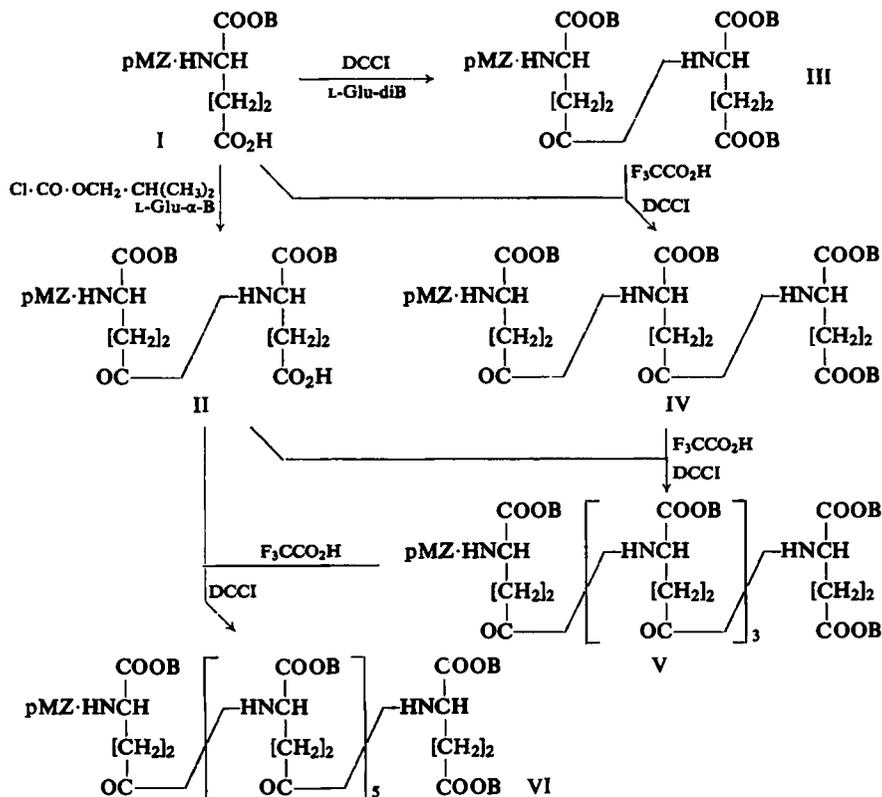
11) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 35 [1960].

12) Oxydative Freisetzung der Carboxylgruppe aus Phenylhydraziden nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und K. KÜHN, Chem. Ber. 84, 381 [1951].

13) F. WEYGAND und W. STEGLICH, Z. Naturforsch. 14b, 472 [1959].

14) J. Amer. chem. Soc. 75, 4608, 4610 [1953].

Einerseits wurde nun aus pMZ-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester (I) nach der Methode der gemischten Anhydride mittels Chlorameisensäure-isobutylester<sup>15)</sup> und L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester der pMZ- $\gamma$ -Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha,\alpha'$ -dibenzylester (II) gewonnen. Andererseits wurde I mit L-Glutaminsäure-dibenzylester und DCCI zum pMZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester (III) kondensiert.



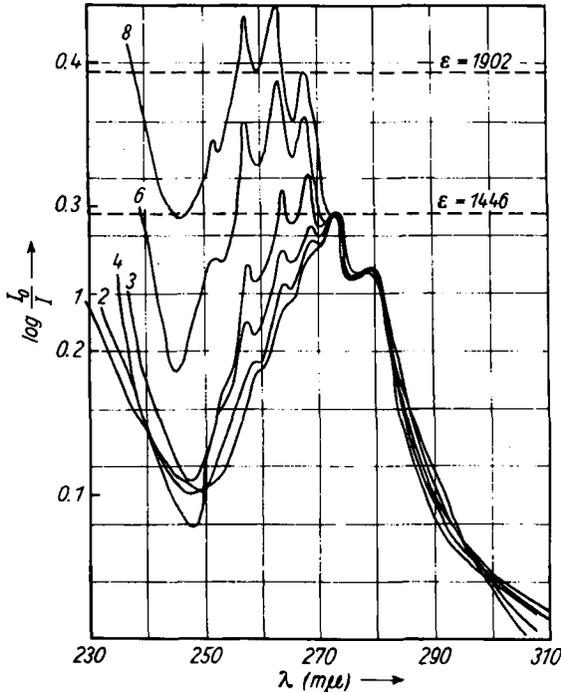
Nach Abspaltung des pMZ-Restes von III mit Trifluoressigsäure wurde mit I und DCCI zum pMZ- $\gamma$ -L-Diglutamyl-L-glutaminsäure-tetrabenzylester (IV) kondensiert. Nun erfolgte nach jeweiliger Abspaltung des pMZ-Restes Kondensation mit II zunächst zum pMZ- $\gamma$ -L-Tetraglutamyl-L-glutaminsäure-hexabenzylester (V) und dann zum gesuchten pMZ- $\gamma$ -L-Hexaglutamyl-L-glutaminsäure-octabenzylester (VI) (jeweils in Dimethylformamid). VI wurde kristallin erhalten und ist aus Dimethylformamid/Äther umkristallisierbar. Auch IV und V kristallisierten.

Bei allen Verbindungen wurde das Verhältnis der Anzahl der Benzylestergruppen: pMZ-Rest UV-spektroskopisch kontrolliert. Die Aufnahme eines pMZ-Glutaminsäure-benzylesters im UV-Licht zeigt ein gut differenziertes Spektrum, in dem, wie ein Vergleich mit den Spektren von Benzylalkohol<sup>16)</sup> und *p*-Methoxy-benzylalkohol

<sup>15)</sup> T. WIELAND und H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 [1951]; R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta 34, 874 [1951]; J. R. VAUGHAN JR., J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 [1951].

<sup>16)</sup> T. W. CAMPBELL und S. LINDEN, J. Amer. chem. Soc. 69, 880 [1947].

zeigt, die beiden längstwelligen Maxima bei 279 und 273  $m\mu$  dem pMZ-Rest zuzuordnen sind. Die sich nach kürzeren Wellenlängen anschließenden Maxima bei 267,5,



Abbild. 1. Absorptionsspektren von:

- (1) pMZ-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester
  - (2) pMZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ , $\alpha'$ -dibenzylester
  - (3) pMZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester
  - (4) pMZ- $\gamma$ -L-Diglutamyl-L-glutaminsäure-tetrazbenzylester
  - (6) pMZ- $\gamma$ -L-Tetraglutamyl-L-glutaminsäure-hexabenzylester
  - (8) pMZ- $\gamma$ -L-Hexaglutamyl-L-glutaminsäure-octabenzylester
- Lösungsmittel Acetonitril,  $c = 0.000211$  für alle Verbindungen

263, 257 und 252  $m\mu$  gehören der Benzylgruppe zu. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, aus dem Intensitätsverhältnis ausgewählter Banden das Verhältnis von Benzyl: pMZ-Rest (*p*-Methoxybenzyl-) zu bestimmen. Abbild. 1 zeigt die Spektren von 6 verschiedenen derartigen Estern in Acetonitril<sup>17)</sup>. Man erkennt deutlich den einseitigen Anstieg der Extinktion bei Zunahme der Benzylestergruppen, wohingegen sich die Maxima des pMZ-Anteiles bei allen Kurven decken.

Die Bestimmung der molaren Extinktionen für die ausgewählten Wellenlängen 273  $m\mu$  für den pMZ-Rest und 267,5  $m\mu$  für den Benzylesterteil liefert die in Tab. 1 aufgeführten Werte.

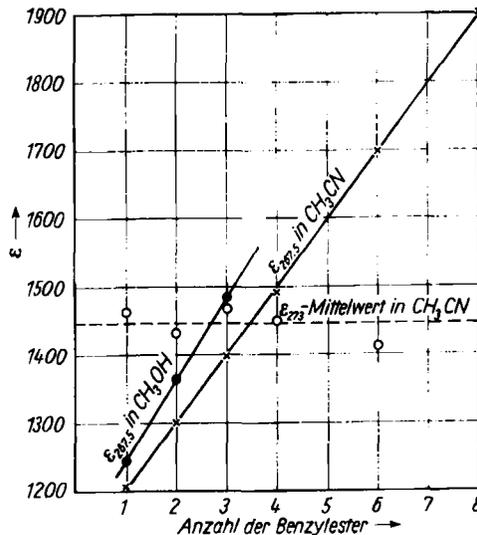
Es ergibt sich eine geradlinige Beziehung zwischen der Extinktion der Benzylestergruppen bei 267,5  $m\mu$  und deren Anzahl, bezogen auf die Extinktionen des pMZ-

<sup>17)</sup> Zunächst nahmen wir die Messungen in Methanol vor, in dem sich aber die höheren Ester kaum mehr lösten. Alle Messungen wurden mit einem Beckman DK 2-Spektralphotometer durchgeführt.

Tab. 1. Molare Extinktionen von pMZ- $\gamma$ -L-[Glu]<sub>n</sub>-benzylestern in Acetonitril; vgl. Abbild. 1

pMZ- $\gamma$ -L-[Glu] <sub>n</sub> - X-benzylester	n	X	Mol.- Gew.	Einwaage (mg/100 ccm)	log <i>c</i>	molare Extinktionen bei	
						273 m $\mu$	267.5 m $\mu$
1	1		401.4	28.56	0.85218-4	1462	1219
2	2		620.7	63.1	0.00717-3	1435	1300
2	3		710.7	50.3	0.84988-4	1467	1399
3	4		930.0	11.99	0.11034-4	1451	1482
5	6		1368.5	28.83	0.32356-4	1415	1700
7	8		1806.9	nicht eingewogen	0.80785-5	1446*)	1902

\*) Da der pMZ-Glu-Peptid-octabenzylester schwer löslich ist, wurde er nicht eingewogen. Die molare Extinktion  $\epsilon_{267.5 \text{ m}\mu}$  ermittelte man für den Mittelwert  $\epsilon_{273 \text{ m}\mu} = 1446$ .



Abbild. 2. Molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{267.5 \text{ m}\mu}$  der pMZ- $\gamma$ -L-Glutaminsäure-benzylester als Funktion der Anzahl der Benzylester

Restes bei 273 m $\mu$  (Abbild. 2), was beweist, daß unsere Verbindungen die richtige Zahl von Benzylestergruppen tragen. Das kann aus den Elementaranalysen der höheren Ester nicht mehr mit Sicherheit geschlossen werden.

Im Versuchsteil wird eine Anzahl von Verbindungen beschrieben, die bei den Versuchen mit dem Z-Rest dargestellt wurden. Es sind dies:

- Z-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -dicyclohexylammoniumsalz
- Z-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz
- Z-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester
- Z-L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester
- Z- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha,\alpha'$ -dibenzylester
- Z- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester
- Z- $\gamma$ -L-Diglutamyl-L-glutaminsäure-tetrabenzylester
- Z-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -thiophenylester
- Z- $\gamma$ -L-Glutamyl-glycin- $\alpha$ -benzylester
- Z-Glycyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester
- Z-Glycyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz
- Z-L-Glutamin-benzylester

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure-anhydrid: 2.0 g (6.4 mMol) *p*MZ-*L*-Glutaminsäure<sup>1)</sup> wurden mit 10 ccm Acetanhydrid bei  $-10^{\circ}$  versetzt. Es trat eine leichte Gasentwicklung ein. Nach einigen Stdn., wobei die Temperatur auf  $0^{\circ}$  stieg, war alles in Lösung gegangen. Hierauf wurde im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur eingedampft und der Rückstand mit 10 ccm Chloroform/Äther (1:1 vol.) versetzt und einige Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Es hatte sich ein Öl ausgeschieden, das beim kurzen Schütteln kristallisierte. Schmp.  $87-88^{\circ}$ , Ausb. 1.6 g (85%).

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -dicyclohexylammoniumsalz: 1.6 g (5.4 mMol) *p*MZ-Glutaminsäure-anhydrid wurden mit 8 ccm frisch dest. Benzylalkohol 1.5 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde bei Raumtemperatur 1.0 g (5.5 mMol) Dicyclohexylamin zugegeben, wobei die Mischung warm wurde (Wasserkühlung!). Nach 2stdg. Stehenlassen im Eisschrank versetzte man mit 40 ccm Diisopropyläther und saugte das ausgeschiedene Salz nach einer weiteren Stunde ab: 1.66 g (53%), nach Umkrist. aus Methanol/Wasser und Wasser Schmp.  $163-164^{\circ}$ , feine Nadeln,  $[\alpha]_{D}^{26}$ :  $-12.5^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{578}^{26}$ :  $-12.9^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{446}^{26}$ :  $-14.4^{\circ}$  ( $c = 2.95$ , in absol. Methanol).

$C_{21}H_{23}NO_7 \cdot C_{12}H_{23}N$  (582.8) Ber. C 68.02 H 7.96 N 4.81  
Gef. C 67.65 H 7.89 N 4.83

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz: Nach mehreren Tagen war aus der Mutterlauge des voranstehenden Versuchs ein krist. Niederschlag entstanden, der aus Methanol/Diisopropyläther umkristallisiert wurde: 0.635 g (20%), Schmp.  $146-147^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{D}^{25}$ :  $+4.2^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{578}^{25}$ :  $+4.44^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{546}^{25}$ :  $+5.5^{\circ}$  ( $c = 2.37$ , in absol. Methanol).

$C_{21}H_{23}NO_7 \cdot C_{12}H_{23}N$  (582.8) Ber. C 68.02 H 7.96 N 4.81  
Gef. C 68.09 H 8.02 N 4.68

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl-*L*-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester (I): a) 1 g des Dicyclohexylammoniumsalzes wurde in 15 ccm Methanol und 10 ccm Wasser gelöst und mit 15 g Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) 2 Stdn. stehengelassen. Nach dem Abfiltrieren des Austauschers und Nachwaschen wurde i. Vak. eingedampft und der ölige Rückstand mit wenig Tetrachlorkohlenstoff über Nacht im Eisschrank stehengelassen: Nach Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser 0.32 g (74%), Schmp.  $70-71^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{D}^{25}$ :  $-9.0^{\circ}$  ( $c = 2.34$ , in Eisessig).

$C_{21}H_{23}NO_7$  (401.4) Ber. C 62.80 H 5.78 N 3.49 Gef. C 62.77 H 5.73 N 3.36

b) aus *L*-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester und *p*MZ-Azid: 2.37 g (10 mMol) *L*-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester<sup>14)</sup> und 0.8 g (20 mMol) Magnesiumoxyd wurden in 20 ccm Wasser und 2.28 g (11 mMol) *p*MZ-Azid in 20 ccm Dioxan 2 Stdn. gerührt<sup>1)</sup>. Nach der üblichen Aufarbeitung<sup>1)</sup> lagen 3.59 g (89.5%) vor, Schmp. nach zweimaligem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff  $68-70^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{D}^{25}$ :  $-9.3^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{578}^{25}$ :  $-9.3^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{546}^{25}$ :  $-10.2^{\circ}$  ( $c = 2.26$ , in Eisessig).

$C_{21}H_{23}NO_7$  (401.4) Ber. N 3.49 Gef. N 3.42

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\gamma$ -*L*-glutamyl-*L*-glutaminsäure- $\alpha$ - $\alpha'$ -dibenzylester (II): Zur Lösung von 4.01 g (10 mMol) *p*MZ-*L*-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester, 2.38 ccm (10 mMol) Tri-*n*-butylamin und 1.37 ccm (10 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester in 25 ccm Dioxan wurde die Lösung von 3.54 g (15 mMol) Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester und 2.08 g (15 mMol) Kaliumcarbonat in 25 ccm Wasser gegeben und 30 Min. bei  $0^{\circ}$  gerührt. Die fast klare Lösung wurde über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und i. Vak. auf 15 ccm eingengt, mit einigen ccm Wasser versetzt und einmal mit wenig Äther ausgeschüttelt. Dann wurde die wäßrige Phase mit 6 *n* HCl angesäuert. Das ausfallende Öl wurde schnell fest.

Das Öl wurde in Essigester aufgenommen, die Lösung dreimal mit Essigester ausgeschüttelt, die vereinigten Extrakte getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. verdampft. Es hinterblieben 2.86 g (46.2%), nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther und Methanol/Wasser Schmp. 133–135°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-5.15^\circ$ ,  $[\alpha]_{378}^{25}$ :  $-5.75^\circ$ ,  $[\alpha]_{346}^{25}$ :  $-5.95^\circ$  ( $c = 2.52$ , in Eisessig).

$C_{33}H_{36}N_2O_{10}$  (620.7) Ber. C 63.86 H 5.84 N 4.50 Gef. C 63.52 H 5.89 N 4.52

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester (III): 3.0 g (8.25 mMol) L-Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid wurden in 20 ccm absol. Tetrahydrofuran mit 1.4 ccm (8.25 mMol) Triäthylamin versetzt, und nach 2 Stdn. wurde das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrochlorid (95.7%) abgesaugt. Zur Lösung des freien Esters wurden 3.0 g (7.5 mMol) *p*MZ-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester und 1.55 g (7.5 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran gegeben. Nach mehrstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde 24 Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. 1.17 g (69.5%) Dicyclohexylharnstoff wurden abgetrennt. Das Tetrahydrofuran wurde i. Vak. abgedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 3-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 0.5 *n* HCl und wieder mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen i. Vak. lagen 3.40 g (64%) vor, umkristallisiert aus Methanol/Wasser und Methanol, Schmp. 124–126°,  $[\alpha]_D^{26}$ :  $-3.76^\circ$ ,  $[\alpha]_{378}^{26}$ :  $-4.31^\circ$ ,  $[\alpha]_{346}^{26}$ :  $-4.54^\circ$  ( $c = 4.52$ , in absol. Methanol).

$C_{40}H_{42}N_2O_{10}$  (710.8) Ber. C 67.70 H 5.96 N 3.95 Gef. C 67.69 H 6.17 N 4.10

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\gamma$ -L-diglutamyl-L-glutaminsäure-tetrabenzylester (IV): 5.68 g (8 mMol) *p*MZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester wurden mit 2 ccm Anisol und unter Eiskühlung mit 10 ccm Trifluoressigsäure versetzt. Unter starker Kohlendioxidentwicklung trat innerhalb weniger Sek. vollständige Lösung ein. Nach weiteren 30 Min. wurde i. Vak. die Trifluoressigsäure abgedampft und der Rückstand in absol. Äther aufgenommen. Zur Fällung des Tribenzylesters als Hydrochlorid wurde trockener Chlorwasserstoff eingeleitet, bis sich kein öliges Niederschlag mehr abschied. Der Äther wurde dekantiert, und das Öl wurde im Vakuumexsikkator über Diphosphorpentoxyd getrocknet. Die Verbindung kristallisierte nicht. Das ölige Hydrochlorid wurde in 25 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst, und mit 1.63 ccm (12 mMol) Triäthylamin wurde das Amin freigemacht. Nach mehrstündigem Stehenlassen wurden 68% Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert. Die Lösung wurde mit der Lösung von 3.12 g (7.8 mMol) *p*MZ-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester in 20 ccm Tetrahydrofuran und 1.65 g (8 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 15 ccm Tetrahydrofuran zwei Tage bei 20° und einen Tag im Eisschrank aufbewahrt. Dann wurden 47.5% Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Das Filtrat wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in Essigester gelöst, mit Wasser, 0.5 *n* HCl, 3-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der feste Rückstand wurde mit etwas Äther verrieben und abgesaugt: 4.42 g (61%), aus Essigester/Petroläther umkrist., Schmp. 147–149°,  $[\alpha]_D^{27}$ :  $-5.4^\circ$ ,  $[\alpha]_{378}^{27}$ :  $-5.9^\circ$ ,  $[\alpha]_{346}^{27}$ :  $-6.46^\circ$  ( $c = 2.56$ , in Eisessig).  $[\alpha]_D^{24}$ :  $-16.4^\circ$ ,  $[\alpha]_{378}^{24}$ :  $-18.2^\circ$ ,  $[\alpha]_{346}^{24}$ :  $-20.3^\circ$  ( $c = 1.4$ , in Dimethylformamid).

$C_{52}H_{55}N_3O_{13}$  (930.0) Ber. C 67.15 H 5.96 N 4.52 Gef. C 67.11 H 5.69 N 4.52

*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl- $\gamma$ -L-tetraglutamyl-L-glutaminsäure-hexabenzylester (V): Von 3.26 g (3.5 mMol) der voranstehenden Verbindung wurde mit 5 ccm Trifluoressigsäure unter Zusatz von 1 ccm Anisol, wie voranstehend beschrieben, der *p*MZ-Rest abgespalten und das Hydrochlorid hergestellt. Dieses wurde in absol. Tetrahydrofuran mit 0.5 ccm (3.6 mMol) Triäthylamin in das freie Amin verwandelt. Nach Abtrennung des Triäthylamin-hydrochlorids (99%) wurde das Tetrahydrofuran i. Vak. verdampft und der Rückstand in 100 ccm Acetonitril gelöst. Hierzu gab man die Lösung von 2.4 g (3.87 mMol) *p*MZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ , $\alpha'$ -dibenzylester in 100 ccm Acetonitril und die Lösung von 0.75 g (3.64 mMol)

*Dicyclohexylcarbodiimid* in 50 ccm Acetonitril. Nach längerem Stehenlassen bei Raumtemperatur und einem Tag im Eisschrank wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit Dimethylformamid digeriert. Es hinterblieben 0.41 g (50%) an Dicyclohexylharnstoff. Das Dimethylformamid wurde sodann im Ölpumpenvakuum bei einer Badtemperatur von maximal 70° abdestilliert. Nach Versetzen mit Äther konnten 1.6 g (35%) des Pentapeptidderivates, Schmp. 169–171°, abgetrennt werden, aus Dimethylformamid/Äther umkrist., Schmp. 175–176°. Die Verbindung kann auch aus Acetonitril oder Tetrahydrofuran umkristallisiert werden.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-19.3^\circ$ ,  $[\alpha]_{578}^{25}$ :  $-20.0^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25}$ :  $-22.5^\circ$  ( $c = 2.8$ , in Dimethylformamid).

$C_{76}H_{81}N_5O_{19}$  (1368.5) Ber. C 66.71 H 5.97 N 5.12 Gef. C 66.45 H 5.82 N 5.31

Die N-Werte von zwei weiteren Ansätzen lagen bei 5.28 und 5.19%.

*p-Methoxybenzylloxycarbonyl- $\gamma$ -L-hexaglutamyl-L-glutaminsäure-octabenzylester (VI)*: 1.49 g (1.08 mMol) der voranstehenden Verbindung wurden mit 6 ccm Trifluoressigsäure und 0.6 ccm Anisol vom pMZ-Rest befreit. Die Trifluoressigsäure wurde i. Vak. verdampft, und beim Versetzen mit Äther kristallisierte das Trifluoacetat des Pentapeptid-hexabenzylesters aus, Schmp. 147–150°. Es wurde durch Einleiten von Chlorwasserstoff in die äther. Suspension in das Hydrochlorid verwandelt, und das ölige Hydrochlorid wurde im Vakuumexsikator über Diphosphorpentoxid getrocknet. Das Amin wurde in 25 ccm Tetrahydrofuran mit 0.45 ccm Triäthylamin freigesetzt, das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrochlorid wurde nicht abgetrennt. Man versetzte vielmehr mit 30 ccm Dimethylformamid und verdampfte das Tetrahydrofuran i. Vak., filtrierte etwas Triäthylamin-hydrochlorid ab und gab eine Lösung von 0.925 g (1.5 mMol) *pMZ- $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha,\alpha'$ -dibenzylester* in 15 ccm Dimethylformamid sowie die Lösung von 0.25 g (1.2 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 10 ccm Dimethylformamid zu. Nach zweitägigem Aufbewahren wurden 75% des Dimethylformamids bei einer Badtemperatur von maximal 50° abdestilliert, etwas Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das restliche Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert. Nach Zugabe von Methanol erhitzte man bis zum Sieden und saugte die ausgefallene Verbindung ab: 0.882 g (49%), Schmp. 185–187°, zweimal aus Dimethylformamid/Äther umkrist., Schmp. 189–191° (Sintern ab 187°).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-19.8^\circ$ ,  $[\alpha]_{578}^{25}$ :  $-20.8^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25}$ :  $-23.4^\circ$  ( $c = 1.31$ , in Dimethylformamid).

$C_{100}H_{107}N_7O_{25}$  (1806.9) Ber. C 66.47 H 5.97 N 5.43 Gef. C 65.81 H 6.18 N 5.78

#### Sonstige Verbindungen

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -dicyclohexylammoniumsalz*<sup>18)</sup>: 37.7 g (0.143 Mol) *Z-L-Glutaminsäure-anhydrid* wurden mit 100 ccm frisch dest. *Benzylalkohol* 100 Min. auf 80–100° erhitzt. Nach weiterem 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde mit 28.0 g (1.1 Mol) *Dicyclohexylamin* versetzt und geschüttelt. Alsbald erstarrte die Masse. Nach 1stdg. Aufbewahren im Eisschrank wurde mit 200 ccm Diisopropyläther versetzt, verrührt und abgesaugt. 48.8 g (62%) Rohprodukt, aus Methanol/Diisopropyläther umkrist. 37.7 g (47%) reines Produkt, Schmp. 163–164°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-13.1^\circ$  ( $c = 3.22$ , in absol. Methanol), Lit.<sup>19)</sup> Schmp. 163–164°,  $[\alpha]_D$ :  $-12.8^\circ$  (absol. Methanol).

$C_{32}H_{44}N_2O_6$  (552.6) Ber. C 69.55 H 8.03 N 5.08 Gef. C 69.70 H 7.94 N 5.13

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz*: Die Mutterlauge aus dem voranstehenden Versuch wurde mit 200 ccm Äther versetzt und mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt; 16.7 g (20%) farbloses Salz wurden abgesaugt, mit Äther gewa-

<sup>18)</sup> Darstellung analog *N*-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester- $\gamma$ -dicyclohexylammoniumsalz, F. WEYGAND und K. HUNGER, Z. Naturforsch. 13b, 50 [1958].

<sup>19)</sup> E. KLEGER, E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. 640, 157 [1961].

schen und aus Methanol/Diisopropyläther umkristallisiert, lange farblose Nadeln, Schmp. 144–146°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +7.94° ( $c = 2.87$ , in absol. Methanol), Lit.<sup>19)</sup>: Schmp. 142–145°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +7.3° (absol. Methanol).

$C_{32}H_{44}N_2O_6$  (552.6) Ber. C 69.55 H 8.03 N 5.08 Gef. C 69.71 H 8.01 N 4.95

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester*: 27.6 g (0.05 Mol) des entspr. *Dicyclohexylammoniumsalzes* wurden in 600 ccm Methanol/Wasser (7:5 vol.) gelöst und mit 60 g Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) geschüttelt. In der Lösung fielen alsbald Kristalle aus. Der Ionenaustauscher wurde abgesaugt und mit Methanol mehrere Male gewaschen, die Filtrate eingengt. 15.7 g (85%), Schmp. 94–96°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –11.7° ( $c = 3.15$ , in Eisessig), Lit.<sup>14)</sup>:  $[\alpha]_D^{25}$ : –10.4° (in Eisessig).

$C_{20}H_{21}NO_6$  (371.4) Ber. C 64.67 H 5.70 N 3.78 Gef. C 64.46 H 5.69 N 3.77

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester*: Analog der Vorschrift beim entsprechenden  $\alpha$ -Benzylester wurden mit Dowex 50 aus 31.0 g (0.056 Mol) *Z- $\beta$ -Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz* nach Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff 13.8 g (66.4%) *Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester*, Schmp. 69–71°, erhalten,  $[\alpha]_D^{25}$ : –24.0° ( $c = 3.5$ , in  $n$  KHCO<sub>3</sub>), Lit.<sup>20)</sup>: Schmp. 76–78°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –23.0° ( $n$  KHCO<sub>3</sub>).

$C_{20}H_{21}NO_6$  (371.4) Ber. C 64.67 H 5.70 N 3.78 Gef. C 64.46 H 5.66 N 3.83

*Carbobenzoxy- $\gamma$ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ - $\alpha'$ -dibenzylester*: Die Darstellung erfolgte analog der entsprechenden pMZ-Verbindung, Ausb. 58%, Schmp. 139–142° (aus Methanol/Wasser),  $[\alpha]_D^{25}$ : –5.4° ( $c = 2.23$ , in Eisessig).

$C_{32}H_{34}N_2O_9$  (590.6) Ber. C 65.08 H 5.80 N 4.74 Gef. C 65.02 H 5.94 N 4.69

21% Ausbeute wurden bei der Darstellung aus *Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -thiophenylester* und *Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester* in Eisessig<sup>21)</sup> erhalten, Schmp. und Misch-Schmp. 145–148°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –5.75° ( $c = 1.93$ , in Eisessig).

$C_{32}H_{34}N_2O_9$  (590.6) Ber. C 65.08 H 5.80 N 4.74 Gef. C 64.85 H 5.93 N 4.62

*Carbobenzoxy- $\gamma$ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylester*: Die Darstellung erfolgte analog der entsprechenden pMZ-Verbindung mittels *Dicyclohexylcarbodiimids*, Ausb. 76%, umkrist. aus Methanol/Wasser, Schmp. 134–137°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –5.1° ( $c = 2.17$ , in Eisessig), Lit.<sup>22)</sup>: –5.2° (Eisessig).

$C_{39}H_{40}N_2O_9$  (680.8) Ber. C 68.80 H 5.92 N 4.12 Gef. C 68.88 H 5.88 N 4.22

*Carbobenzoxy- $\gamma$ -L-diglutamyl-L-glutaminsäure-tetrabenzylester*: Zur Abspaltung des Z-Restes aus der voranstehenden Verbindung wurden 2.72 g mit 1 ccm Anisol und 8 ccm wasserfreier Trifluoressigsäure 40 Min. auf 80° erhitzt, die Trifluoressigsäure i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Äther aufgenommen und durch Einleiten von Chlorwasserstoff das ölige Hydrochlorid des  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-tribenzylesters gefällt.

Im übrigen wurde wie bei der Darstellung der analogen pMZ-Verbindung verfahren. Ausb. 1.31 g (41%), mehrfach aus Äthanol/Wasser umkrist. Schmp. 140°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –4.45° ( $c = 2.0$ , in Eisessig), Lit.<sup>22)</sup>: –5.3° (in Eisessig).

$C_{51}H_{53}N_3O_{12}$  (900.0) Ber. C 68.06 H 5.94 N 4.67 Gef. C 67.90 H 6.18 N 4.99

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -thiophenylester*: 1.86 g (5 mMol) *Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester* wurden in 20 ccm Tetrahydrofuran mit 0.52 ccm (5 mMol) *Thiophenol* und 1.13 g (5.5 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach Auf-

<sup>20)</sup> W. E. HANBY, S. G. WALEY und J. WATSON, J. chem. Soc. [London] 1950, 3239.

<sup>21)</sup> Methode F. WEYGAND und W. STEGLICH, Chem. Ber. 93, 2983 [1960].

<sup>22)</sup> H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 76, 1811 [1954].

bewahren über Nacht bei 20° wurden 88.5% Dicyclohexylharnstoff abgetrennt und die Lösung i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde zweimal mit Äther digeriert: 2.24 g (97% Rohprodukt). Aus Essigester/Petroläther feine Nadeln, Schmp. 91–93°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-2.3^\circ$  ( $c = 2.16$ , in Tetrahydrofuran).

$C_{26}H_{25}NO_5S$  (463.6) Ber. C 67.36 H 5.44 N 3.03 Gef. C 67.03 H 5.43 N 2.90

*Carbobenzoxy- $\gamma$ -L-glutamyl-glycin- $\alpha$ -benzylester*: a) Aus dem *Thiophenylester* durch Erhitzen mit *Glycin* in Eisessig<sup>21)</sup>. 1.39 g (3 mMol) der voranstehenden Verbindung und 0.23 g (3 mMol) *Glycin* wurden in 8 ccm Eisessig 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach 15 Min. war alles *Glycin* gelöst. Der Eisessig wurde i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen, zweimal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt und die wäßrige Phase mit konz. Salzsäure angesäuert: Öl, das alsbald kristallisierte, 0.65 g (51%), Schmp. 114–116° nach Umkrist. aus Äthanol/Wasser,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-5.5^\circ$  ( $c = 2.19$ , in Eisessig).

$C_{22}H_{24}N_2O_7$  (428.5) Ber. C 61.67 H 5.65 N 6.54 Gef. C 61.67 H 5.68 N 6.16

b) Nach der Methode der gemischten Anhydride mit *Chlorameisensäure-isobutylester*: Hierbei betrug die Ausb. 68%, Schmp. und Misch-Schmp. 115–117°.

*Carbobenzoxy-glycyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester*: 1.5 g (5 mMol) *Carbobenzoxy-glycin-thiophenylester* und 1.19 g (5 mMol) *L-Glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester* wurden in 15 ccm Eisessig 1½ Stdn. auf 100° erhitzt. Nach Verdampfen des Eisessigs i. Vak. wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und zweimal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Hierbei ergaben sich drei Schichten, von denen die Mittelschicht nach dem Ansäuern mit konz. Salzsäure und Aufnehmen in Essigester 0.562 g (26%) lieferte, aus Essigester/Petroläther Schmp. 113–114°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-4.45^\circ$  ( $c = 2.26$ , in Eisessig).

$C_{22}H_{24}N_2O_7$  (428.5) Ber. C 61.67 H 5.65 N 6.54 Gef. C 61.11 H 5.69 N 6.61

*Carbobenzoxy-glycyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -dicyclohexylammoniumsalz*: 3.01 g (10 mMol) *Carbobenzoxy-glycin-thiophenylester* und 2.38 g (10 mMol) *L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester* wurden in 30 ccm Eisessig 1½ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach der üblichen Aufarbeitung<sup>21)</sup> wurde die Verbindung in Methanol mit 2.0 g *Dicyclohexylamin* versetzt. Ausb. an *Dicyclohexylammoniumsalz* 4.03 g (66%), Schmp. 133–135°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+8.65^\circ$  ( $c = 1.5$ , in absol. Methanol).

$C_{22}H_{24}N_2O_7 \cdot C_{12}H_{23}N$  (609.8) Ber. C 66.97 H 7.77 N 6.90  
Gef. C 67.15 H 8.23 N 6.90

*Carbobenzoxy-L-glutamin-benzylester*: 0.83 g *Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -thiophenylester* wurden mit 3 g Ammoniumacetat 10 Min. bei 120–130° geschmolzen<sup>21)</sup>. Nach Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit etwas Wasser versetzt und der entstandene Niederschlag nach mehrstündigem Stehenlassen abgesaugt, getrocknet und aus Essigester umkristallisiert, 0.51 g (69%), Schmp. 129–130°, leichte Nadeln;  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-7.5^\circ$  ( $c = 0.67$ , in Eisessig), Lit.<sup>23)</sup>: Schmp. 123°.

$C_{20}H_{22}N_2O_5$  (370.4) Ber. C 64.85 H 5.99 N 7.56 Gef. C 64.79 H 6.00 N 7.73

<sup>23)</sup> M. BERGMANN, L. ZERVAS und L. SALZMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1288 [1933].