

GÜNTER LOSSE, HANS JESCHKEIT und DIETER KNOPF

Peptidsynthesen mittels monoaktivierter Diester der Aminodicarbonsäuren¹⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle-Wittenberg

(Eingegangen am 4. November 1963)

Monoaktivierte Diester der *N*-Cbo-Asparaginsäure werden dargestellt und zur Peptidsynthese verwendet. Monoaktivierte Aminodicarbonsäure-benzylester lassen sich zum stufenweisen Aufbau und zur Polymerisation von Aminodicarbonsäure-peptiden jeden Bindungstyps einsetzen.

Kürzlich berichteten wir über die Darstellung monoaktivierter Diester der *N*-Cbo-Glutaminsäure²⁾ und ihre Anwendung als Schlüsselverbindungen zum vereinfachten Aufbau von Glutamylpeptiden^{3,4)}. Ausgehend von den reinen isomeren *N*-Cbo-Asparaginsäure-monobenzylestern haben wir nun nach der Carbodiimid⁵⁾, POCl₃⁶⁾ bzw. der Chloracetonitril-Methode⁷⁾ eine Anzahl der entsprechenden Monoaktivierungsprodukte der Asparaginsäurereihe hergestellt (s. Tab. S. 1793).

Der benötigte *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäure- α -benzylester ließ sich analog dem *N*-Cbo-*L*-Glutaminsäure- α -benzylester²⁾ durch Auftrennung des bei der Alkoholyse von *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäureanhydrid gebildeten Gemisches aus α - und β -Monoester mit 0,5-proz. NH₄Cl-gepufferter Ammoniaklösung⁸⁾ gewinnen.

Er war bisher nach M. BERGMANN, L. ZERVAS und L. SALZMANN⁹⁾ bzw. in der Modifikation von G. L. MILLER, O. K. BEHRENS und V. DU VIGNEAUD¹⁰⁾ aus Cbo-Asparaginsäureanhydrid oder aus *L*-Asparaginsäure-dibenzylester durch partielle β -Entbenzylierung mit Jodwasserstoff und anschließende Carbobenzoxylierung¹¹⁾ relativ mühsam zugänglich.

Analog²⁾ oder durch Äthanolyse in Gegenwart von DCHA nach der Methode von E. KLEGER und H. GIBIAN¹²⁾ haben wir auch *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäure- α -äthylester in guter Ausbeute rein gewonnen. Die isomeren *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäure- β -monoalkyl- bzw. - β -monobenzylester, die sich bei der Alkoholyse des *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäureanhydrids nur in geringer Menge bilden, erhält man dagegen zweckmäßig un-

1) IV. Mitteil. über Peptidsynthesen in der Aminodicarbonsäurereihe.

2) I. Mitteil.: G. LOSSE, H. JESCHKEIT und W. LANGENBECK, Chem. Ber. 96, 204 [1963]; sowie Z. Chem. 1, 279 [1961].

3) II. Mitteil.: G. LOSSE, H. JESCHKEIT und R. HÖHN, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

4) III. Mitteil.: G. LOSSE, H. JESCHKEIT und H. ZASCHKE, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

5) M. ROTHE und F. W. KUNITZ, Liebigs Ann. Chem. 609, 88 [1957].

6) TH. WIELAND und B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. 615, 184 [1958].

7) R. SCHWYZER und Mitarbb., Helv. chim. Acta 38, 80 [1955].

8) Versuche von P. BISCHOFF, Diplomarb., Univ. Halle 1962.

9) Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 1288 [1933].

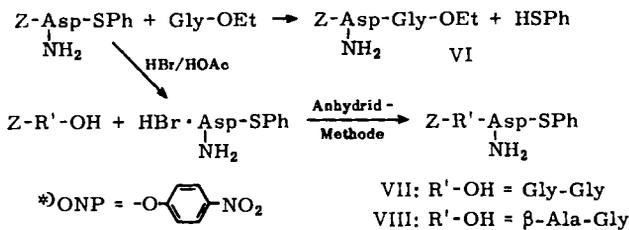
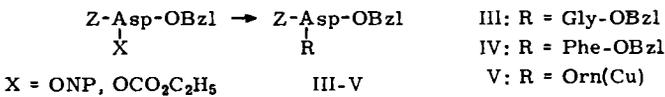
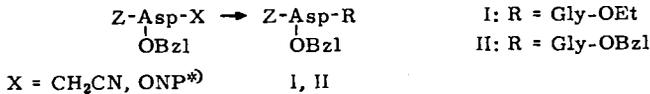
10) J. biol. Chemistry 140, 411 [1941].

11) P. M. BRYANT, R. H. MOORE, P. J. PIMLOTT und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] 1959, 3868.

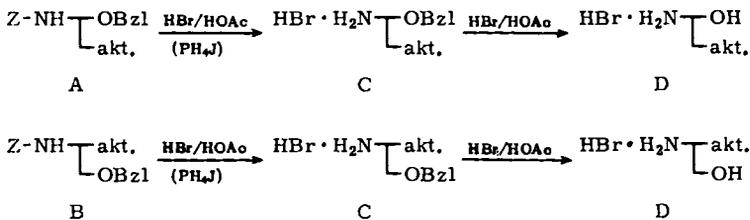
12) Liebigs Ann. Chem. 655, 195 [1962].

mittelbar aus der freien Säure durch Veresterung und nachträgliche Carbobenzylierung¹³⁻¹⁷). Ebenso wurde bei den Asparaginderivaten der Tab. direkt von L-Asparagin ausgegangen.

Die vielseitige Anwendbarkeit dieser monoaktivierten Diester und der aktivierten Asparaginderivate zum Aufbau von α - und β -Asparagyl- sowie -Asparaginylopeptiden zeigen die folgenden Synthesebeispiele *).



Besonders einfach sind die Synthesen bei Verknüpfung von Aktivierungsprodukten der *N*-Cbo-Aminodicarbonsäure-mono benzylester mit Aminosäure- oder Peptidbenzylestern, da dann die nachträgliche Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen in



*) Abkürzungen in Anlehnung an die Nomenklaturvorschläge des Peptid-Symposiums in Oxford 1962.

13) H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS und I. H. PAGE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5697 [1957].

14) D. COLEMAN, J. chem. Soc. [London] **1951**, 2294.

15) M. BERGMANN und L. ZERVAS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **221**, 51 [1933].

16) N. IZUMIYA, H. UCHINO und T. YAMASHITA, Nippon Kagaku Zassi **79**, 420 [1958], C. A. **54**, 4408 [1960].

17) Vgl. ferner E. W. HANBY, S. G. WALEY und J. WATSON, J. chem. Soc. [London] **1950**, 3239; A. BERGER und E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4084 [1951]; TH. WIELAND und H. L. WEIDENMÜLLER, Liebigs Ann. Chem. **597**, 111 [1955]; R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD und J. P. WALLER, Helv. chim. Acta **38**, 1491 [1955].

einem Schritt unter schonenden Bedingungen möglich ist. Die *N*-geschützten Glutaminsäure- oder Asparaginsäure-diester vom Typ A und B lassen sich, im Fall B wegen der erhöhten Reaktionsfähigkeit ω -ständiger Benzylestergruppen jedoch nur unter besonderer Vorsicht¹⁸⁾, mit 15-proz. HBr/Eisessig-Lösung selektiv zu den freien Diestern entcarboboxylieren¹⁹⁾.

Wie wir fanden, kann man die Cbo-Gruppe selektiv neben α - oder ω -Benzylestergruppen auch mit Phosphoniumjodid in Eisessig (bei papierchromatographischer Kontrolle des Umsatzes) abspalten. Die so erhältlichen Diester (C) oder die durch vollständige Entfernung der Schutzgruppen resultierenden aktivierten Monoester der freien Dicarbonsäuren (D) sind wertvolle Ausgangsstoffe für den Aufbau definierter Polyverbindungen mit Poly- α - bzw. Poly- ω -Peptidbindungen.

Derartige Polyverbindungen, speziell die struktur- und stereoisomeren Polyglutaminsäuren, besitzen großes synthetisches und biochemisches Interesse im Hinblick auf das Konstitutionsproblem der Anthrax- und Subtilis-Polypeptide (APP und SPP)^{20, 21)}, als Modellsubstanz für Spezifitätsuntersuchungen der Peptidasen sowie im Zusammenhang mit anderen biochemischen Fragen²²⁾. In Verbindung mit diesen Problemkreisen und aus synthetischen Fragestellungen heraus wurden Poly- α - und Poly- ω -glutamin-^{23, 24)} sowie -asparaginsäuren²⁵⁾ von verschiedenen Seiten bereits synthetisiert.

Die Anwendung der monoaktivierten Dicarbonsäure-benzylester ermöglicht nun speziell einmal die schonende Knüpfung aller denkbaren Peptidbindungen zwischen mehreren gleichartigen oder verschiedenen Aminodicarbonsäuren, zum anderen den gezielten Aufbau von Poly-aminodicarbonsäuren mit vorher festgelegter Sequenz und Verknüpfungsart der Bausteine. Dies geht aus nachstehenden Synthesebeispielen hervor.

Mit *N*- und α -geschützter Asparaginsäure haben wir β -ständig entweder α -aktivierten (1) oder γ -aktivierten (2) Glutaminsäure-benzylester nach der Carbodiimidmethode zu XI bzw. XII verknüpft. Entcarboboxylierung von XI (3) ohne Rücksicht auf eine eventuelle teilweise Entbenzylierung der Carboxylgruppen, anschließende Polymerisation (4) und schließlich vollständige hydrogenolytische Abspaltung aller C-Schutzgruppen führt zur Poly-(β -asparagyl- α -glutaminsäure) (XIII). Der nach Weg (2) gewonnene Dipeptid-triester XII kann als Ausgangssubstanz für Poly-asparagylglutaminsäure mit ausschließlich vorhandenen ω -Peptidbindungen dienen.

Prinzipiell können die nach Weg (1) oder (2) gewonnenen *N*-Cbo-Triester (XI und XII) an der aktivierten Carboxylgruppe mit freien Aminodicarbonsäure-monobenzylestern bzw. Peptiden schrittweise weiter verlängert und erneut aktiviert werden. Ferner lassen sich nach

18) L. KISFALUDY, S. DUALSZKY und J. BAYER, *Chimia* [Zürich] **14**, 368 [1960].

19) M. GOODMAN und K. C. STUEBEN, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 3980 [1959].

20) V. BRUCKNER und J. KOVÁCS, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* **12**, 363 [1957].

21) A. C. CHIBNALL, M. W. REES und F. M. RICHARDS, *Biochem. J.* **68**, 129 [1958].

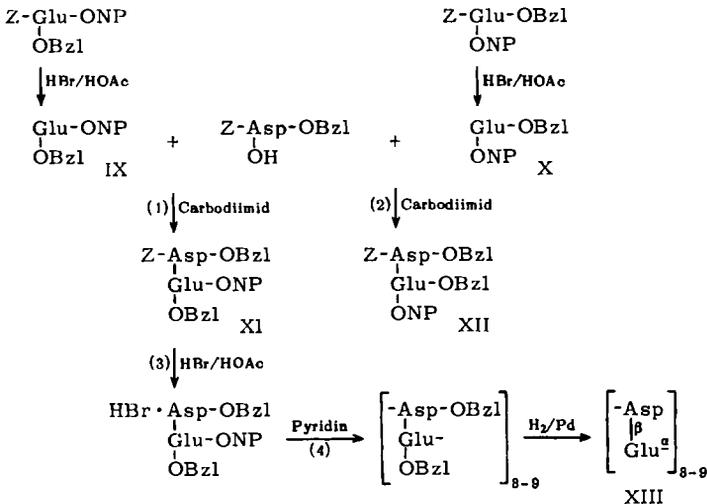
22) F. WEYGAND und K. HUNGER, *Chem. Ber.* **95**, 7 [1962].

23) V. BRUCKNER und Mitarbb., *Tetrahedron* [London] **2**, 211 [1958]; *Naturwissenschaften* **44**, 90 [1957], und frühere Arbeiten.

24) W. E. HANBY, S. G. WALEY und J. WATSON, *J. chem. Soc.* [London] **1950**, 3239.

25) V. BRUCKNER, T. VAJDA und J. KOVÁCS, *Naturwissenschaften* **41**, 449 [1954]; M. FRANKEL und A. BERGER, *J. org. Chemistry* **16**, 1513 [1951]; R. H. KARLSON und Mitarbb., *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2268 [1960]; M. GOODMAN, C. DEBER und A. FELIX, ebenda **84**, 3773 [1962]; A. BERGER und E. KATCHALSKI, ebenda **73**, 4084 [1951]; E. KATCHALSKI und M. SELA, *Advances in Protein Chemistry* **13**, 407 ff. [1958].

dem gleichen Aufbauprinzip durch Verknüpfung von *N*-Cbo-Aminodicarbonsäure- α - bzw. - ω -monobenzylestern²⁾ mit monoaktivierten Diestern in anderer Kombination Amino-dicarbonsäure-polypeptide mit jeder gewünschten Bindungsart und Sequenz der Bausteine durch Polymerisation gezielt aufbauen.



Die Molgewichtsbestimmung der Polymerisationsprodukte durch quantitative Ermittlung der freien endständigen Asparaginsäure-Aminogruppe²⁶⁾ nach VAN SLYKE^{*)} ergab ein mittleres Molgewicht von 3100, einem Polymerisationsgrad von 8–9 Asparagyl-glutaminsäure-Molekülen entsprechend.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

A. Ausgangsstoffe

1. *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäure- α -benzylester

a) *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäure-monobenzylester-Gemisch: 18 g *N*-Cbo-*L*-Asparaginsäureanhydrid^{9, 10, 27)} werden mit 16 g absol. Benzylalkohol im geschlossenen Kolben 4 Stdn. auf 100° erhitzt. Das in 200 ccm Äther aufgenommene Öl wird mit 45 ccm 5-proz. Ammoniaklösung ausgeschüttelt, die ammoniakalische Phase mit 15-proz. Salzsäure kongosauer gestellt, das ausgefallene Öl in Äther aufgenommen und die Ätherphase mit Wasser salzsäurefrei gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Ausb. 22.8 g (87% d. Th.).

b) *N*-Cbo- α -Benzylester: 20–22 g des sirupösen Estergemisches werden in 250 ccm Äther gelöst und im Scheidetrichter mit 150 ccm 0.5-proz. NH₄Cl-gepufferter Ammoniaklösung (pro l der 0.5-proz. Lösung 40 g NH₄Cl) durchgeschüttelt, wobei sich 3 Schichten bilden. Die obere, ätherische Phase wird abgetrennt, mit weiteren 30 ccm Extraktionslösung behandelt und erneut abgetrennt. Die dabei anfallende wäbr. und ölige Phase vereinigt man mit der aus der ersten Extraktion, behandelt schließlich die äther. Phase noch einmal mit 20 ccm Extraktionslösung analog und schlägt den wäbr. Auszug den früheren Auszügen zu. Die

*) Für die VAN-SLYKE-Bestimmung danken wir Herrn Dr. FITTKAU vom Institut für Physiologische Chemie der Universität Halle.

²⁶⁾ N. LICHTENSTEIN, J. Amer. chem. Soc. **64**, 1021 [1942].

²⁷⁾ E. WÜNSCH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **328**, 235 [1962].

Monoaktivierte Diester der *N*-Cbo-Asparaginsäure und monoaktivierte Verbindungen der Asparaginsäure

	Darst. nach	% Ausb.	Schmp. °C	$[\alpha]_D$	Lösungs- mittel (c)	Analyse
<i>N</i> -Cbo-L-Asparaginsäure- - α -benzylester- β -thiophenylester	A	85	108—109	$[\alpha]_D^{22} - 26.2^\circ$	Äthanol (0.668)	$C_{25}H_{23}NO_5S$ (449.5) Ber. C 66.79 H 5.16 N 3.12 Gef. C 66.82 H 4.90 N 3.18
	B	72	107—108	$[\alpha]_D^{22} - 19.5^\circ$	Äthanol (0.677)	$C_{25}H_{22}N_2O_8$ (478.4) Ber. C 62.76 H 4.64 N 5.86 Gef. C 62.71 H 4.81 N 5.76
	A	78	106—107			
	C	82	77	$[\alpha]_D^{20} - 12.0^\circ$	Äthanol (0.420)	$C_{21}H_{20}N_2O_6$ (396.4) Ber. C 63.63 H 5.09 N 7.07 Gef. C 63.19 H 5.11 N 7.09
- α -benzylester- β -phenylester	A	80	86	$[\alpha]_D^{20} - 14.2^\circ$	Pyridin (0.203)	$C_{25}H_{23}NO_6$ (433.4) Ber. C 69.27 H 5.35 N 3.23 Gef. C 68.84 H 5.25 N 3.41
<i>N</i> -Cbo-DL-Asparaginsäure- - β -benzylester- α -thiophenylester	A	90	112—113	—	—	$C_{25}H_{23}NO_5S$ (449.5) Ber. C 66.79 H 5.16 N 3.12 Gef. C 66.51 H 5.33 N 3.20
	B	44.5				
- β -benzylester- α - <i>p</i> -nitrophenylester	A	67	95—96	—	—	$C_{25}H_{22}N_2O_8$ (478.4) Ber. C 62.76 H 4.64 N 5.86 Gef. C 62.21 H 4.66 N 5.97
- β -benzylester- α -cyanmethylester	C	80	65—67	—	—	$C_{21}H_{20}N_2O_6$ (396.4) Ber. C 63.63 H 5.09 N 7.07 Gef. C 63.45 H 5.24 N 7.35
Cbo-L-Asparagin-thiophenylester	A	82	177	$[\alpha]_D^{22} - 66.6^\circ$	DMF (0.531)	$C_{18}H_{18}N_2O_4S$ (358.4) Ber. C 60.36 H 5.06 N 7.82 Gef. C 60.04 H 5.03 N 7.78
Formyl-L-asparagin-thiophenylester	A	76	155—157	$[\alpha]_D^{20} - 140.5^\circ$	Äthanol (0.512)	$C_{11}H_{12}N_2O_3S$ (252.3) Ber. C 52.36 H 4.79 N 11.15 Gef. C 52.22 H 4.77 N 11.08

verbleibende äther. Lösung extrahiert man mit 40 ccm 5-proz. Ammoniaklösung quantitativ, säuert den Auszug an, nimmt das ausgefallene Öl wieder in Äther auf, wäscht mit Wasser salzsäurefrei, trocknet mit Natriumsulfat und versetzt mit Petroläther. Der *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -benzylester* kristallisiert nach kurzer Zeit (Frakt. 1), 1,5 g, Schmp. 84–85°.

Zur Gewinnung weiteren *N-Cbo- α -Benzylesters* werden die gesammelten Ammoniumsals-extrakte einschließlich der öligen Anteile mit Salzsäure angesäuert, das gesamte ölige Benzyl-estergemisch in 250 ccm Äther aufgenommen und nach Neutralwaschen der Lösung mit Wasser das Extraktionsverfahren mit insgesamt 140 ccm Extraktionslösung in 3 Teilen von 100:20:20 ccm wiederholt (Frakt. 2, 5,3 g, Schmp. 83–85°).

Durch Wiederholung dieser Operationen mit 100 ccm Extraktionslösung in Anteilen von 50:30:20 ccm (Frakt. 3, 3,8 g, Schmp. 83–85°) und mit 70 ccm Lösung in Anteilen von 40:20:10 (Frakt. 4, 3,1 g, Schmp. 83–84°) wurden insgesamt 13,7 g *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -benzylester* gewonnen, nach Umkristallisieren aus Äther/Petroläther ein einheitliches Produkt vom Schmp. 84–85°. $[\alpha]_D^{20}$: -9.66° ($c = 5.59$, in Eisessig).

$C_{19}H_{19}NO_6$ (357.4) Ber. C 63.87 H 5.36 N 3.92 Gef. C 63.62 H 5.27 N 3.84

*DCHA-Salz*²⁸⁾: Schmp. 118–119°, $[\alpha]_D^{20}$: $+6.0^\circ$ ($c = 1.0$, in Äthanol).

$C_{19}H_{19}NO_6 \cdot C_{12}H_{23}N$ (538.7) Ber. C 69.11 H 7.86 N 5.20 Gef. C 69.01 H 7.22 N 5.38

2. *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -äthylester-DCHA-Salz*

2,6 g (0,01 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäureanhydrid*, in 50 ccm absol. Äther suspendiert, werden mit 2,34 g (0,04 Mol) Äthanol und danach mit 1,96 ccm *Dicyclohexylamin* in wenig Äther unter Rühren bei Raumtemperatur versetzt. Nach 3stdg. Rühren wird über Nacht stehengelassen, abgesaugt und mit Äther gewaschen. Ausb. 3,9 g (81% d. Th.), Schmp. 157 bis 158° (Äthanol/Äther/Petroläther). $[\alpha]_D^{20}$: $+8.2^\circ$ ($c = 0.85$, in Äthanol).

$C_{14}H_{17}NO_6 \cdot C_{12}H_{23}N$ (483.6) Ber. C 64.60 H 8.34 N 5.79 Gef. C 64.41 H 8.47 N 6.01

Der Ester wird durch Auflösen von 2,7 g des DCHA-Salzes in 150 ccm 50-proz. Äthanol und $\frac{1}{2}$ stdg. Behandeln mit Ionenaustauscher Wofatit KPS 200 (H^{\oplus}) freigesetzt. Nach Abtrennen des Austauschers und Einengen der Lösung wird in Äther aufgenommen. Ausb. 1,1 g, Schmp. 83–84°, $[\alpha]_D^{20}$: -16.0° ($c = 1.00$, in Äthanol).

$C_{14}H_{17}NO_6$ (295.3) Ber. C 56.95 H 5.80 N 4.74 Gef. C 56.67 H 5.73 N 4.83

3. *N-Cbo-DL-Asparaginsäure- β -benzylester* wurde nach l. c.¹⁶⁾ gewonnen. Schmp. 103–105°.

B. Darstellung der aktivierten Ester

Allgemeine Vorschriften

1. *Carbodiimid-Methode*⁵⁾ (A): 0,01 Mol *N-Cbo-Asparaginsäure-monobenzylester* (*Cbo- oder Formyl-asparagin*) wird, in 40 ccm Essigester gelöst, mit 1,32 ccm *Thiophenol* (bzw. 1,67 g *p-Nitro-phenol*, 1,13 g *Phenol*) versetzt und die Lösung auf -25° abgekühlt. Nach Zusatz von 2,27 g *Dicyclohexylcarbodiimid* wird 2 Stdn. bei -25° und anschließend 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Der ausgefallene *Dicyclohexylharnstoff* wird abgesaugt und die Lösung i. Vak. eingedampft. Die erhaltenen Rohprodukte kristallisiert man aus Äthanol um.

2. *POCl₃-Verfahren*⁶⁾ (B): 0,01 Mol *N-Cbo-Asparaginsäure-monobenzylester*, 1,1 ccm *Thiophenol* bzw. 1,4 g *p-Nitro-phenol* und 0,93 ccm *POCl₃* werden, in 50 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst, bei -15° tropfenweise mit 2,4 ccm (0,03 Mol) *Pyridin* versetzt. Der Ansatz wird 1 Stde. bei Raumtemperatur stehengelassen, das Lösungsmittel nach Zusatz von 20 ccm Wasser i. Vak. abgedampft. Der in Essigester gelöste Rückstand wird mit gesätt. $NaHCO_3$ -

²⁸⁾ E. Klieger, E. Schröder und H. Gbian, Liebigs Ann. Chem. 640, 157 [1961].

Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das nach Eindampfen der Essigester-Lösung erhaltene Rohprodukt aus Äthanol umkristallisiert.

3. *Chloracetonitril-Verfahren*⁷⁾ (C): 0.01 Mol *N-Cbo-Asparaginsäure-monobenzylester* wird mit 2.1 ccm *Triäthylamin* und 1.9 ccm *Chloracetonitril* 30 Min. im Wasserbad auf 70° erhitzt. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen, versetzt mit wenig Essigester, saugt das kristalline ausgefallene *Triäthylaminhydrochlorid* ab und dampft das Filtrat i. Vak. ein. Der kristalline Rückstand wird aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

C. Peptidsynthesen

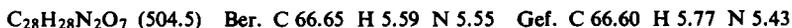
1. *N-Cbo- α -DL-Asparagyl(β -benzylester)-glycin-äthylester (I)*

a) 3.96 g (0.01 Mol) *N-Cbo-DL-Asparaginsäure- β -benzylester- α -cyanmethylester* und 2.06 g (0.02 Mol) *Glycin-äthylester* werden in 20 ccm absol. Essigester gelöst, mit einigen Tropfen Eisessig versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Essigester-Lösung mit verd. Salzsäure, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand liefert aus Äthanol 3.9 g (88% d. Th.) I, Schmp. 111–112°.

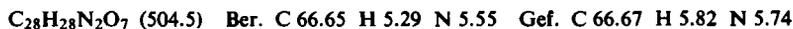


b) 4.78 g (0.01 Mol) *N-Cbo-DL-Asparaginsäure- β -benzylester- α -p-nitrophenylester* und 1.03 g (0.01 Mol) *Glycin-äthylester* bleiben, in 30 ccm Chloroform gelöst, über Nacht stehen. Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. und Aufarbeitung des Rückstands wie oben ergibt 3.38 g (76% d. Th.) I, Schmp. 110–111°.

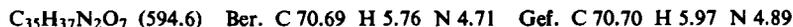
2. *N-Cbo- α -DL-Asparagyl(β -benzylester)-glycin-benzylester (II)*: 2.39 g (0.05 Mol) *N-Cbo-DL-Asparaginsäure- β -benzylester- α -p-nitrophenylester* werden, in 25 ccm Acetonitril gelöst, mit 1.62 g (0.05 Mol) *Glycin-benzylester-benzolsulfonat* und 0.7 ccm *Triäthylamin* versetzt. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gehalten und wie unter 1. a) aufgearbeitet. Ausb. 1.8 g (71.5% d. Th.) II, Schmp. 83° (aus Essigester/Petroläther).



3. *N-Cbo- β -L-Asparagyl(α -benzylester)-glycin-benzylester (III)*: 4.78 g (0.01 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -benzylester- β -p-nitrophenylester* und 3.3 g (0.02 Mol) *Glycin-benzylester* werden, in 30 ccm Chloroform gelöst, 5 Stdn. bei 0° und 48 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wird der Reaktionsansatz mit Chloroform auf das 3fache Vol. verdünnt, 8–10mal mit 1 *n* NH_3 , 2mal mit 1 *n* HCl und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat engt man die Chloroformlösung i. Vak. ein und kristallisiert den Rückstand aus Essigester/Petroläther um. Ausb. 3.9 g (77.5% d. Th.) III, Schmp. 123 bis 124°. $[\alpha]_D^{25}$: -9.2° ($c = 1.09$, in DMF).



4. *N-Cbo- β -L-Asparagyl(α -benzylester)-L-phenylalanin-benzylester (IV)*: 2.39 g (0.05 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -benzylester- β -p-nitrophenylester*, 2.14 g (0.05 Mol) *L-Phenylalanin-benzylester-p-toluolsulfonat* und 0.7 ccm *Triäthylamin* werden in 30 ccm Chloroform gelöst und der Reaktionsansatz wie unter 3. aufgearbeitet. Ausb. 1.9 g (64% d. Th.) IV, Schmp. 136–138° (aus Essigester/Petroläther). $[\alpha]_D^{25}$: -14.5° ($c = 1.07$, in Eisessig).



5. *N-Cbo- β -L-Asparagyl(α -benzylester)- δ -L-ornithin (V)*

a) 7.14 g (0.02 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäure- α -benzylester* werden, in 80 ccm Tetrahydrofuran gelöst, bei -10° mit 2.8 ccm (0.02 Mol) *Triäthylamin* und 2.1 ccm (0.02 Mol) *Chlor-*

ameisensäure-äthylester versetzt. Nach 30 Min. läßt man unter Rühren innerhalb 1 Stde. eine wäbr. Lösung von *L-Ornithin-Cu-Komplex·HCl* (hergestellt aus 6.8 g (0.04 Mol) *L-Ornithinhydrochlorid* und basischem Kupfercarbonat²⁹⁾) sowie 8.4 ccm (0.06 Mol) *Triäthylamin* in 30 ccm Tetrahydrofuran und 20 ccm Wasser zutropfen. Es wird 2 Stdn. weitergerührt und der Dipeptid-Cu-Komplex in Eiswasser ausgefällt. Ausb. 5.3 g (51.1% d. Th.). Zur Entfernung des Kupfers wird in einer Mischung von 50 ccm Wasser und 10 ccm Eisessig suspendiert und unter Rühren bis zur Entfärbung mit 10-proz. KCN-Lösung versetzt. Nach mehrstdg. Belassen im Eisschrank wird abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 4.3 g (86.7% d. Th.) *V*, Schmp. 190°, $[\alpha]_D^{25}$: -5.4° ($c = 1.0$, in Eisessig).

$C_{24}H_{29}N_3O_7$ (471.5) Ber. C 61.13 H 6.20 N 8.91 Gef. C 60.74 H 6.38 N 9.03

b) β -*L-Asparagyl- δ -L-ornithin*: 1 g des *Dipeptidesters V* wird, in 100 ccm Eisessig gelöst, mit 0.3 g Pd-Mohr 5 Stdn. hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird i. Vak. eingengt und der Rückstand aus Wasser/Aceton umgefällt. Ausb. 0.5 g (96% d. Th.), Schmp. $>245^\circ$ (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $+43.6^\circ$ ($c = 1.0$, in 1 *n* HCl). R_F 0.55 (Butanol/Eisessig/Wasser), Schleicher & Schüll 2043 b; R_F 0.36 (Phenol/Wasser).

$C_9H_{17}N_3O_5$ (247.3) Ber. C 43.72 H 6.93 N 17.00 N*) 11.34
Gef. C 43.75 H 7.17 N 16.51 N*) 11.51

* prim. NH_2 , bestimmt nach VAN SLYKE.

6. *N-Cbo-L-Asparagyl-glycin-äthylester (VI)*: Zu einer Lösung von 6.88 g (0.02 Mol) *N-Cbo-L-Asparagin-thiophenylester* in 20 ccm Chloroform werden 3.36 g (0.024 Mol) *Glycin-äthylester-hydrochlorid* und 3.5 ccm (0.025 Mol) *Triäthylamin* gegeben. Der Ansatz wird über Nacht stehengelassen, die entstehende gallertartige Masse nach Zusatz von Essigester abgesaugt und aus Essigester/Äthanol umkristallisiert. Ausb. 5.8 g (83% d. Th.), Schmp. 189 bis 190°, $[\alpha]_D^{25}$: -35.6° ($c = 0.18$, in Äthanol).

$C_{16}H_{21}N_3O_6$ (351.4) Ber. C 54.69 H 6.02 N 11.96 Gef. C 54.97 H 6.13 N 11.92

7. *N-Cbo-Glycyl-glycyl-L-asparagin-thiophenylester (VII)*

a) *L-Asparagin-thiophenylester-hydrobromid* wird aus *N-Cbo-L-Asparagin-thiophenylester* durch Behandeln mit *Bromwasserstoff*/Eisessig in 94-proz. Ausb. gewonnen. Schmp. 174° (aus Äthanol), $[\alpha]_D^{25}$: $+77.3^\circ$ ($c = 0.54$, in Wasser).

$C_{10}H_{12}N_2O_2S \cdot HBr$ (305.2) Ber. N 9.18 Gef. N 9.36

2.66 g (0.01 Mol) *N-Cbo-Glycyl-glycin* werden, in 50 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst, mit 1.44 ccm (0.01 Mol) *Triäthylamin* versetzt und bei -15 bis -20° mit 0.1 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* zum gemischten Anhydrid kondensiert. Nach 30 Min. gibt man bei -20° weitere 1.4 ccm *Triäthylamin* und 3.05 g (0.01 Mol) *L-Asparagin-thiophenylester-hydrobromid* in THF/Wasser zu, läßt den Ansatz 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen und dampft das Tetrahydrofuran i. Vak. ab. Der Rückstand, in Essigester nicht löslich, wird mit verd. Salzsäure, $NaHCO_3$ -Lösung sowie Wasser gewaschen und aus Essigester/Dimethylformamid umkristallisiert. Ausb. 3.1 g (65.5% d. Th.) *VII*, Schmp. 204–205°, $[\alpha]_D^{25}$: -56.6° ($c = 0.58$, in DMF).

$C_{22}H_{24}N_4O_2S$ (472.5) Ber. C 55.92 H 5.12 N 11.86 Gef. C 55.50 H 5.36 N 11.71

b) *Glycyl-glycyl-L-asparagin-thiophenylester-hydrobromid*: Der Cbo-Rest wird durch Behandeln von *VII* mit *HBr*/Eisessig abgespalten. Das Esterhydrobromid (87% d. Th.) wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Schmp. 185–187°, $[\alpha]_D^{25}$: -77.6° ($c = 0.46$, in Wasser).

$C_{14}H_{18}N_4O_4S \cdot HBr$ (419.3) Ber. N 13.36 Gef. N 13.34

²⁹⁾ A. NEUBERGER und F. SANGER, *Biochem. J.* 37, 515 [1943].

8. a) *N-Cbo-β-Alanyl-glycyl-L-asparagin-thiophenylester (VIII)* erhält man, wie unter 7. a) beschrieben. Anstelle des *N-Cbo-Glycyl-glycins* werden 2.8 g (0.01 Mol) *N-Cbo-β-Alanyl-glycin* eingesetzt. Ausb. 3.1 g (63.3% d. Th.), Schmp. 183–184° (aus Essigester/Dimethylformamid), $[\alpha]_D^{20}$: -51.0° ($c = 0.53$, in DMF).

$C_{23}H_{26}N_4O_5S$ (486.5) Ber. C 56.77 H 5.39 N 11.52 Gef. C 56.55 H 5.61 N 11.46

b) *β-Alanyl-glycyl-L-asparagin-thiophenylester-hydrobromid*: Die Abspaltung des Cbo-Restes aus VIII führt zu einem hygroskopischen Rohprodukt, das durch Umkristallisieren aus Äthanol/Äther gereinigt werden kann. Ausb. 80% d. Th., Schmp. 164–167°, $[\alpha]_D^{20}$: -71.0° ($c = 0.75$, in Wasser).

$C_{15}H_{20}N_4O_4S \cdot HBr$ (433.3) Ber. N 12.93 Gef. N 12.89

D. Polymerisation der Aminodicarbonsäuren

L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-p-nitrophenylester-hydrobromid (entspr. IX): 2 g *N-Cbo-L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-p-nitrophenylester*²⁾ wurden unter Erwärmen in 5 ccm absol. Eisessig gelöst und nach dem Abkühlen mit 5 ccm 30-proz. *HBr*/Eisessig versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Min. wurde der Ansatz mit 150 ccm absol. Äther versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Ausb. 0.9 g (50% d. Th.), Schmp. 123.5° (aus Eisessig/Äther)¹⁹⁾, $[\alpha]_D^{20}$: $+29.3^\circ$ ($c = 2.06$, in Äthanol); R_F 0.623 (Propanol/Wasser 7:3, Schleicher & Schüll 2043 b).

$C_{18}H_{18}N_2O_6 \cdot HBr$ (439.3) Ber. C 49.21 H 4.36 N 6.38 Gef. C 48.90 H 4.31 N 6.46

L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-p-nitrophenylester-hydrojodid (entspr. IX): 1.5 g *N-Cbo-L-Glutaminsäure-γ-benzylester-α-p-nitrophenylester* wurden in 20 ccm absol. Eisessig suspendiert und nach Zusatz von 2 g *Phosphoniumjodid* unter Zuleiten von trockenem *Wasserstoff* 4 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der geringe Anteil von nichtumgesetztem Phosphoniumjodid wurde abfiltriert und das gebildete *Hydrojodid* mit absol. Äther gefällt. Ausb. 0.65 g (43.8% d. Th.), Schmp. 132–134° (aus Eisessig/Äther), $[\alpha]_D^{20}$: $+6.3^\circ$ ($c = 1.27$, in Eisessig), R_F 0.622 (Propanol/Wasser 7:3, Schleicher & Schüll 2043 b).

$C_{18}H_{18}N_2O_6 \cdot HJ$ (486.3) Ber. C 44.46 H 3.94 N 5.76 Gef. C 44.33 H 4.28 N 5.95

L-Glutaminsäure-α-benzylester-γ-p-nitrophenylester-hydrobromid (entspr. X): 2 g *N-Cbo-L-Glutaminsäure-α-benzylester-γ-p-nitrophenylester*²⁾ wurden unter Erwärmen in 5 ccm absol. Eisessig gelöst, nach dem Erkalten mit 5 ccm 30-proz. *HBr*/Eisessig versetzt und 4 Min. mit 200 ccm absol. Äther gefällt. Ausb. 0.76 g (42% d. Th.), Schmp. 128–131°, $[\alpha]_D^{20}$: $+6.3^\circ$ ($c = 1.05$, in Äthanol).

$C_{18}H_{18}N_2O_6 \cdot HBr$ (439.3) Ber. C 49.21 H 4.36 N 6.38 Gef. C 49.37 H 4.30 N 6.68

L-Glutaminsäure-α-benzylester-γ-p-nitrophenylester-hydrojodid (entspr. X): 1.5 g *N-Cbo-L-Glutaminsäure-α-benzylester-γ-p-nitrophenylester* wurden in 40 ccm absol. Eisessig gelöst und nach Zusatz von 2 g *Phosphoniumjodid* unter Durchleiten von trockenem *Wasserstoff* 4 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das *Hydrojodid* wurde mit absol. Äther gefällt und aus absol. Äthanol/Äther umkristallisiert. Ausb. 0.55 g (37% d. Th.), Schmp. 140–142° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $+9.6^\circ$ ($c = 1.076$, in Äthanol).

$C_{18}H_{18}N_2O_6 \cdot HJ$ (486.3) Ber. C 44.46 H 3.94 N 5.76 Gef. C 44.37 H 4.17 N 6.04

N-Cbo-β-L-Asparagyl(α-benzylester)-L-glutaminsäure-γ-benzylester-α-p-nitrophenylester (XI): 1.8 g (0.005 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäure-α-benzylester* wurden in 100 ccm absol. Essigester bei -25° mit 1 g *Dicyclohexylcarbodiimid* kondensiert und nacheinander mit 2.2 g (0.005 Mol) *IX-Hydrobromid* und 0.7 ccm (0.005 Mol) absol. *Triäthylamin* versetzt. Nach

45 Min. im Kältebad wurde der Ansatz noch 4–5 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, das *Triäthylamin-hydrobromid* und der *Dicyclohexylharnstoff* abfiltriert. Danach wurde die klare Lösung mit weiterem Triäthylamin (0.7 ccm) versetzt und so lange mit Wasser ausgeschüttelt, bis die Waschflüssigkeit nach dem Ansäuern keine Trübung mehr zeigte. Nach saurer Extraktion mit verd. Salzsäure wurde die Essigesterlösung schließlich mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. auf 40–50 ccm eingengt und mit überschüss. Petroläther versetzt. Ausb. 3.35 g (96% d. Th.) XI, Schmp. 133–135° (aus Äthanol), $[\alpha]_D^{25}$: -30° ($c = 1.0$, in Eisessig).

$C_{37}H_{35}N_3O_{11}$ (697.7) Ber. C 63.70 H 5.06 N 6.02 Gef. C 63.77 H 5.17 N 6.25

N-Cbo-β-L-Asparagyl(α-benzylester)-L-glutaminsäure-α-benzylester-γ-p-nitrophenylester (XII): 1.8 g (0.005 Mol) *N-Cbo-L-Asparaginsäure-α-benzylester* wurden in 100 ccm absol. Essigester bei -25° mit 1 g *Dicyclohexylcarbodiimid* kondensiert und nacheinander mit 2.2 g (0.005 Mol) *X-Hydrobromid* und 0.7 ccm (0.005 Mol) *Triäthylamin* versetzt. Nach 45 Min. im Kältebad wurde der Ansatz noch 4–5 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Aufarbeitung wie bei XI erbrachte 1.75 g (50% d. Th.) XII vom Schmp. 119–121° (Essigester/Petroläther), $[\alpha]_D^{25}$: -10.0° ($c = 1.0$, in Eisessig).

$C_{37}H_{35}N_3O_{11}$ (697.7) Ber. C 63.70 H 5.06 N 6.02 Gef. C 63.87 H 5.09 N 6.28

Poly-(β-L-asparagyl-α-L-glutaminsäure) (XIII): 1.8 g XI wurden mit 20 ccm 15-proz. *HBr*/Eisessiglösung versetzt und 30 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das gebildete *Hydrobromid* wurde mit absol. Äther gefällt (0.8 g), zur Polymerisation in 20 ccm Acetonitril gelöst, mit 0.16 ccm *Pyridin* versetzt und 18 Stdn. auf 40° erwärmt. Durch Füllen mit absol. Äther trennte man die polymere Verbindung ab. Da sich hierbei gleichzeitig das *Pyridinhydrobromid* abschied, wurde das Gemisch in 50 ccm Eisessig gelöst, 24 Stdn. in durchströmendem *Wasserstoff* über Pd-Mohr hydriert und nach Abtrennung des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. der Rückstand in 50 ccm 70-proz. Äthanol aufgenommen; hieraus ließ sich die reine polymere Verbindung bei pH 5–6 nach Zusatz einer verd. Lösung von Kupferacetat als Kupfersalz abzentrifugieren. Ausb. 0.5 g.

$(C_9H_{10}N_2O_6Cu_2)_n$ (369.3)_n Ber. N 7.58 Gef. N 7.48 Mol.-Gew. 3100 nach VAN SLYKE