

TORU OKUDA und HELMUT ZAHN

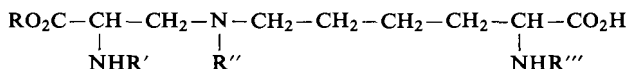
## Synthese von $N^\epsilon$ -[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin, einer neuen Aminosäure aus alkalibehandelter Wolle

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

(Eingegangen am 13. Oktober 1964)

$N^\epsilon$ -[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin (III), das bei Alkalibehandlung von cystinhaltigen Proteinen entsteht, wurde aus  $\alpha$ -Acetamino-acrylsäure-äthylester und  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin in guter Ausbeute synthetisiert. Das  $N^\epsilon$ -dinitrophenylierte Derivat, das im Hydrolysat von alkalibehandelten DNP-Proteinen vorliegen sollte, wurde ebenfalls dargestellt.

Kürzlich wurde von Z. BOHAK<sup>1)</sup> aus dem Hydrolysat von vorher mit 0.1 *n* NaOH behandelte Ribonuclease eine bisher unbekannte Aminosäure,  $N^\epsilon$ -[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin (III) isoliert, die sich mit dem synthetisch erhaltenen Produkt als identisch erwies. Die gleiche Verbindung hat M. SOKOLOVSKY<sup>2)</sup> nach alkalischer Behandlung der beiden Modellverbindungen *N*-Acetyl-*S*-DNP-L-cysteinyl-L-lysin und des Copolymeren (1:4) von *S*-DNP-Cystein und L-Lysin sowie A. PATCHORNIK<sup>3)</sup> aus alkalisch behandelte *S*-dinitrophenylierte, reduzierte Ribonuclease erhalten. Inzwischen wurde III auch von KL. ZIEGLER<sup>4)</sup> im Totalhydrolysat alkalibehandelte Wolle nachgewiesen.



I: R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R' = R''' = CH<sub>3</sub>CO, R'' = H

II: R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R' = R''' = CH<sub>3</sub>CO, R'' = 2.4-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>

III: R = R' = R'' = R''' = H

IV: R = R' = R''' = H, R'' = 2.4-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>

Diese Aminosäure entsteht wahrscheinlich durch Anlagerung einer  $\epsilon$ -Aminogruppe von peptidgebundenem Lysin an den Dehydroalaninrest. Letzterer geht durch  $\beta$ -Eliminierung aus Cystein- oder Serinresten hervor. Die analoge sekundäre Bildung von Lanthionin durch intra- und/oder interchenare Addition von Cystein an Dehydroalanin wurde schon beobachtet<sup>5)</sup>.

1959 gelang S. SAKAKIBARA<sup>6)</sup> die Synthese von Polydehydroalanin aus *N*-Carboxydehydroalanin-anhydrid, und neuerdings konnten A. PATCHORNIK und M. SOKO-

1) Private Mitteil.; inzwischen erschienen in J. biol. Chemistry **239**, 2878 [1964].

2) Ph. D. Thesis, Hebr. Universität Jerusalem, Israel, 1963.

3) A. PATCHORNIK und M. SOKOLOVSKY, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1860 [1964].

4) J. biol. Chemistry **239**, 2713 [1964].

5) M. J. HORN, D. B. JONES und S. J. RINGEL, J. biol. Chemistry **138**, 141 [1941]; siehe auch H. ZAHN, Chimia [Aarau, Schweiz] **15**, 378 [1961].

6) Bull. chem. Soc. Japan **32**, 13 [1959].

LOVSKY<sup>7)</sup> nach Aktivierung der Thiol- oder Hydroxylgruppe einiger cystein- und serinhaltiger Peptide durch Alkalibehandlung in guter Ausbeute die entsprechenden Dehydroalanin-Peptide gewinnen.

Es schien daher zweckmäßig, bei der Synthese der neuen Aminosäure analog ihrem Bildungsmechanismus von einem Acrylsäurederivat auszugehen.  $\alpha$ -Acetamino-acrylsäure-äthylester ( $N$ -Acetyl-dehydroalanin-äthylester) wurde durch Mannich-Reaktion aus Acetamino-malonsäure-monoäthylester, Formaldehyd und Diäthylamin sowie anschließende zersetzende Destillation der Mannich-Base erhalten<sup>8)</sup> und mit  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-lysin umgesetzt.

Die Anlagerung von  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin an die Doppelbindung des Acrylsäureesters zu  $N^\epsilon$ -[2-Acetamino-2-äthoxycarbonyl-äthyl]- $N^\alpha$ -acetyl-L-lysin (I) verlief in Gegenwart der äquivalenten Menge Natronlauge glatt und in guter Ausbeute. Die entstandene Iminosäure ist hygroskopisch, reagiert mit Ninhydrin nur schwach und bildet ein amorphes Pikrat. Ein kristallines  $N^\epsilon$ -Dinitrophenyl-Derivat II konnte erhalten werden.

Bei der vorliegenden Additionsreaktion können zwei Diastereomere, nämlich die L-L- und D-L-Form, entstehen. A. SCHÖBERL und A. WAGNER<sup>9)</sup> erhielten bei der Anlagerung von L-Cystein an  $\alpha$ -Acetamino-acrylsäure überwiegend *meso*-Lanthionin. In Analogie vermuten wir, daß die Addition auch hier durch asymmetrische Induktion des L-Lysins hauptsächlich zur D-L-Form führte.

Durch Verseifen von I mit 6*n* HCl wurde in 60-proz. Ausbeute  $N^\epsilon$ -[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin (III) erhalten, das nach Entfernen der überschüssigen Salzsäure als Dihydrochlorid kristallisierte. Mit Pikrinsäure wurde eine 1:1-Additionsverbindung gebildet. Durch Säurehydrolyse von II wurde  $N^\epsilon$ -[2-Amino-2-carboxy-äthyl]- $N^\epsilon$ -[2,4-dinitro-phenyl]-L-lysin (IV) dargestellt, das von L. LUMPER<sup>10)</sup> auch im Hydrolysat von alkalibehandelten DNP-Proteinen gefunden wurde. Das von uns dargestellte III kann auf der 15-cm-Säule des automatischen Aminosäure-Analysators mit einem Puffer von pH 5.28 als symmetrischer Peak vor Lysin eluiert werden.

Die Integrationskonstante von 1  $\mu$ Mol der neuen Verbindung beträgt das 1.21-fache derjenigen von 1  $\mu$ Mol Lysin.

Für die Einsichtnahme in sein Manuskript sind wir Herrn Dr. Z. BOHAK zu großem Dank verpflichtet. Dem LANDESAMT FÜR FORSCHUNG BEIM MINISTERPRÄSIDENTEN DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN sowie dem INTERNATIONALEN WOLL-SEKRETARIAT (IWS) London und Düsseldorf danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Ferner danken wir den Herren Dr. E. SCHNABEL und Dr. KL. ZIEGLER für wertvolle Diskussionen.

7) „Vth European Peptide Symposium, Oxford, 1962“, S. 253, Pergamon Press, New York 1963.

8) H. HELLMANN, K. TEICHMANN und F. LINGENS, Chem. Ber. **91**, 2427 [1958].

9) Chem. Ber. **80**, 379 [1957].

10) Unveröffentlichte Versuche.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

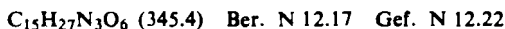
Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Die  $R_F$ -Werte wurden aufsteigend auf Papier Nr. 2043 der Fa. Schleicher & Schüll bestimmt. System A = sek.-Butanol/90-proz. Ameisensäure/Wasser (75:15:10); B = sek.-Butanol/10-proz. Ammoniak (85:15); C = Phenol/Wasser (80:20).

*N<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-lysin*: Die Synthese nach A. NEUBERGER und F. SANGER<sup>11)</sup> wurde abgeändert und ergab eine höhere Ausbeute. 100 g (0.548 Mol) *L-Lysin-monohydrochlorid*, gelöst in 1000 ccm Wasser, wurden mit 150 g basischem  $\text{CuCO}_3$  1 Stde. gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde heiß filtriert und das überschüss.  $\text{CuCO}_3$  gut mit heißem Wasser gewaschen. Man setzte zum Filtrat unter Rühren 417 ccm 2.78 *n*  $\text{NaOH}$  und 100 ccm (0.596 Mol) *Chlorameisensäure-benzylester* bei 0° tropfenweise hinzu. Der ausgefallene *Cu-Komplex* von *N<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-lysin* wurde abgesaugt, mit Wasser sowie Aceton gewaschen und in 1200 ccm 2 *n*  $\text{HCl}$  suspendiert. Dann wurde bei 40°  $\text{H}_2\text{S}$  eingeleitet, nach Absaugen von  $\text{CuS}$  die Mutterlauge eingeeengt, die zurückgebliebene kristalline Masse in einem warmen Gemisch von 300 ccm Methanol und 1000 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung mit Ammoniak auf pH 7 gestellt, wobei sich *Benzyloxycarbonyl-L-lysin* sofort in feinen Kristallen ausschied. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank stehengelassen, die Kristalle wurden abfiltriert und mit warmem Wasser gewaschen. Ausb. 130 g (85%). Eine Probe, aus heißem Wasser umkristallisiert, zeigte  $[\alpha]_D^{25}$ : +14.0° ( $c = 2.08$ , in 2 Äquivv.  $\text{HCl}$ ); Schmp. 248–250° (Lit.:  $[\alpha]_D$ : +14.4°<sup>8)</sup>); Schmp. 255°<sup>12)</sup>).  $R_F$  0.80 (Syst. A), 0.32 (B).

*N<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-N<sup>α</sup>-acetyl-L-lysin* wurde nach NEUBERGER und SANGER<sup>11)</sup> dargestellt. Ausb. 97%,  $R_F$  0.84 (Syst. A), 0.69 (B).

*N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin*: 94 g rohes *N<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-N<sup>α</sup>-acetyl-L-lysin* wurden in einem Gemisch von 400 ccm Methanol und 200 ccm Wasser mit Pd-Mohr katalytisch hydriert. Die Lösung wurde warm vom Katalysator filtriert und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand kristallisierte sofort bei Zusatz von Äthanol. Die Kristalle wurden aus wenig Wasser und Äthanol umkristallisiert. Ausb. 49 g (89%).  $[\alpha]_D^{25}$ : +4.2° ( $c = 4$ , in Wasser), -13.5° ( $c = 4$ , in 2 *n*  $\text{HCl}$ ); Schmp. 246–248° (Lit.<sup>8)</sup>):  $[\alpha]_D$ : +4.7°; Schmp. 250°).  $R_F$  0.24 (Syst. A), 0.02 (B), 0.86 (C).

*N<sup>ε</sup>-[2-Acetamino-2-äthoxycarbonyl-äthyl]-N<sup>α</sup>-acetyl-L-lysin (I)*: 5.64 g (30 mMol) *N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin* wurden in 50 ccm 0.6 *n*  $\text{NaOH}$  gelöst und bei 0 bis 10° unter kräftigem Rühren 4.94 g (31.5 mMol) *α-Acetamino-acrylsäure-äthylester*<sup>6)</sup> portionsweise hinzugefügt. Nach beendeter Zugabe wurde noch 6 Stdn. bei Raumtemperatur weitergerührt, wobei sich der Ester vollständig auflöste. Die Lösung wurde anschließend mit Amberlite XE-64 (H-Form) behandelt und das Eluat bei einer Badtemperatur von 40° i. Vak. unter wiederholter Zugabe von Äthanol zur Trockne gebracht, wobei ein Schaum erhalten wurde. Nach zweimaligem Umfällen aus Methanol/Äther 10 g (96.5%). *I* ist hygroskopisch.  $[\alpha]_D^{25}$ : -5.8° ( $c = 2.06$ , in 2 *n*  $\text{HCl}$ ).  $R_F$  0.11 (Syst. A), 0.00 (B), 0.51 (C).



*N<sup>ε</sup>-[2-Acetamino-2-äthoxycarbonyl-äthyl]-N<sup>ε</sup>-[2,4-dinitro-phenyl]-N<sup>α</sup>-acetyl-L-lysin (II)*: 1.73 g (5.00 mMol) *I* und 1.26 g (15.0 mMol)  $\text{NaHCO}_3$  wurden in 12 ccm Wasser gelöst. Dazu fügte man eine Lösung von 1.4 g (7.5 mMol) *I-Fluor-2,4-dinitro-benzol* in 12 ccm Äthanol und hielt das Gemisch unter starkem Rühren und Lichtausschluß 4 Stdn. bei Raumtemperatur. Dann wurde 2 mal mit Äther extrahiert und mit 6 *n*  $\text{HCl}$  angesäuert, wobei sich ein halbfestes

11) *Biochem. J.* **37**, 515 [1943].

12) M. BERGMANN, L. ZERVAS und W. F. ROSS, *J. biol. Chemistry* **111**, 245 [1935].

gelbes Öl abschied. Nach Waschen mit wenig eiskaltem Wasser wurde über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet, in Äthanol aufgenommen, vom Unlöslichen abfiltriert, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Ausb. 2.0 g (78%). Eine nochmals umkristallisierte Probe zeigte  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-20.2^\circ$  ( $c = 1.25$ , in 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung); Schmp. 96–98°.  $R_F$  0.97 (Syst. A), 0.02 (B), 0.66 (C).

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> · H<sub>2</sub>O (529.5) Ber. C 47.65 H 5.90 N 13.22 Gef. C 48.17 H 5.80 N 13.55

*N*<sup>ε</sup>-[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin (III): 10 g (29 mMol) I wurden mit 250 ccm 6*n* HCl 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde das Hydrolysat i. Vak. eingengt und durch mehrmalige Destillation die überschüss. Salzsäure entfernt, wobei ein Schaum zurückblieb, der i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und KOH getrocknet, dann wieder in Wasser gelöst und mit Aktivkohle behandelt wurde. Nach dem Einengen auf ein kleines Volumen kristallisierte das *N*<sup>ε</sup>-[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-L-lysin-dihydrochlorid beim Reiben nach Zusatz von Äthanol. Ausb. 5.8 g (65%). Weitere 1.0 g eines etwas gefärbten Produktes wurden aus der Mutterlauge gewonnen. Gesamtrohausb. 77%, Schmp. 173–175°. Das Rohprodukt wurde aus wenig Wasser und Äthanol umkristallisiert. Ausb. 5.3 g (60%), Schmp. 176–178°.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+15^\circ$  ( $c = 2$ , in 2*n* HCl, als freie Aminosäure).  $R_F$  0.00 (Syst. A), 0.00 (B), 0.05 (C).

C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]2Cl (306.2) Ber. C 35.30 H 6.91 Cl 23.16 N 13.72

Gef. C 35.31 H 7.10 Cl 22.96 N 13.65

Die Aminosäure bildete bei pH 8–9 ein *Monopikrat*, aus heißem Wasser Schmp. 178–180°. C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (461.4) Ber. C 39.05 H 4.59 N 18.20 Gef. C 38.81 H 4.75 N 18.06

*N*<sup>ε</sup>-[2-Amino-2-carboxy-äthyl]-*N*<sup>ε</sup>-[2.4-dinitro-phenyl]-L-lysin (IV): 1.0 g (2.0 mMol) II wurden 4 Stdn. mit 50 ccm 6*n* HCl verseift. Der beim Einengen hinterbliebene Schaum wurde in Äthanol aufgenommen und die Lösung mit Triäthylamin auf pH 7 gestellt, wobei das gelbliche *DNP-Derivat IV* sofort ausfiel. Es wurde 2mal aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Ausb. 480 mg (61.5%), Schmp. 180–182°;  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+10.4^\circ$  ( $c = 2.5$ , in 2*n* HCl).  $R_F$  0.14 (Syst. A), 0.11 (B), 0.65 (C). UV-Spektrum:  $\lambda_{\max}$  264 und 350 m $\mu$  ( $\log \epsilon$  3.88, 4.16).

C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> (399.4) Ber. C 45.11 H 5.30 N 17.54 Gef. C 44.60 H 5.38 N 17.22