

Hartmut Niedrich

Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden, XI¹⁾

Synthese von substituierten 2.4-Bis-carboxymethyl-1-acyl-semicarbaziden, den α -Aza-asparagin-Peptiden*)

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1115 Berlin-Buch

(Eingegangen am 24. Oktober 1968)

Mit dem Ziel der Synthese von „Analogen“ biologisch aktiver Verbindungen, in denen allein die Polyamidstruktur verändert wird, werden α -Aza-asparaginsäurepeptid-Derivate synthetisiert, die zum Aufbau solcher Analogger geeignet sind. An mehreren Modellverbindungen wird ihr chemisches Verhalten untersucht. — Ausgehend von geschützten N^{β} -Glutaminy- bzw. N^{β} -Lysyl-hydrazinoacetamid und N -Carbonyl-aminosäureestern werden α -Aza-asparaginy-Teilsequenzen des Oxytocins und Eledoisins erhalten.

Über eine funktionelle Rolle der Polyamidkette von Peptiden im biologischen Geschehen, die über stereospezifische Gerüstfunktion hinausgeht, z. B. Energieleitung o. ä., liegen keine eindeutigen Hinweise vor. Eine Unterbrechung der monotonen Amidsequenz in biologisch aktiven Peptiden ohne Beeinträchtigung der funktionell bedeutsamen Aminosäure-Seitenketten und ihrer stereochemischen Anordnung sollte hier Hinweise geben. Die von uns dargestellten Analogger des Eledoisins^{1,2)} und Oxytocins³⁾, in denen Amidbindungen durch Hydrazidbindungen ersetzt sind, beinhalten zusätzlich eine Kettenverlängerung um $-\text{NH}-$ und sind deshalb zur Untersuchung dieser Frage weniger geeignet.

Wegen der nur geringen Unterschiede in Atomabstand und Valenzwinkel sind einmal die Depsi-Analogger von Peptiden, die $-\text{CO}-\text{O}-$ statt $-\text{CO}-\text{NH}-$ enthalten, ein geeignetes Untersuchungsobjekt. An Analogger des Bradykinins und Angiotensins konnten *Schemjakin*, *Schtschukina* et al.^{4,5)} zeigen, daß in einigen Positionen der Austausch einer Amid- gegen

*) Abkürzungen nach IUPAC-Information Bulletin Nr. 25, S. 32 (1966); vgl. auch Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967).

Z = Benzyloxycarbonyl-, Boc = tert.-Butyloxycarbonyl-, ONp = *p*-Nitro-phenylester, Bzl = Benzyl-, -NHGly- = Hydrazinoacetyl-, Azasp(NH₂)- = α -Aza-asparaginy-, DMF = Dimethylformamid, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

1) X. Mittel.: *R. Grupe* und *H. Niedrich*, Chem. Ber. 100, 3283 (1967).

2) *H. Niedrich*, Chem. Ber. 100, 3273 (1967).

3) *H. Niedrich*, *B. Wiegershausen* und *E. Göres*, Proc. of the 2nd Pharmacol. Meeting, Oxytocin, Vasopressin and their Structural Analoges, S. 173, Pergamon Press 1964.

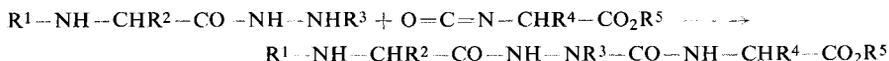
4) *M. M. Schemjakin*, *L. A. Schtschukina*, *E. I. Vinogradova*, *G. A. Ravdel* und *Yu. A. Ovtshinnikow*, Experientia [Basel] 22, 535 (1966); *G. A. Ravdel*, *M. P. Filatowa*, *L. A. Schtschukina* u. a., J. med. Chem. 10, 242 (1967).

5) *E. P. Semkin*, *A. P. Smirnowa* und *L. A. Schtschukina*, J. allg. Chem. (russ.) 38, 2358 (1968).

eine Estergruppe kaum einen Einfluß auf die biologische Wirkung in den Standard-Testen hat. — Andererseits erfüllen die α -Aza-peptide, Peptide, in denen der α -Kohlenstoff eines oder mehrerer Aminosäurereste durch Stickstoff ersetzt ist, diese Voraussetzung.

Die Methoden zur Darstellung der α -Aza-peptide wurden von *Gante* und *Lautsch*^{6,7)} an Modellpeptiden umfangreich bearbeitet. *Hess et al.*⁸⁾ stellten das einzige bisher beschriebene α -Aza-Analoge eines biologisch wirksamen Peptides dar, das 3- α -Aza-valin-Angiotensin. Sie fanden ca. 1% der Angiotensinwirkung.

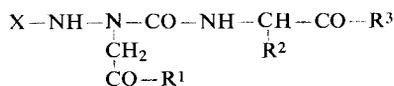
Der meist angewandte Syntheseweg ist die Addition von geschützten Aminosäurehydraziden an *N*-Carbonyl-aminosäureester^{6,8)}:



Bisher sind nur unsubstituierte Hydrazide ($R^3 = H$) und Alkylhydrazide^{8,9)} ($R^3 = CH_3, CH(CH_3)_2, CH_2C_6H_5$) zu den entsprechenden Azaglycin-, Azaalanin-, Azavalin- und Aza-phenylalanin-Peptiden umgesetzt worden.

A. Darstellung einiger α -Aza-asparaginsäurepeptid-Derivate

Geschützte Aminoacylhydrazinoessigsäure-ester bzw. -amide¹⁰⁾ mit freiem α -Stickstoff reagieren beim Erwärmen mit *N*-Carbonyl-aminosäureestern¹¹⁾ in Dioxan zu α -Aza-asparaginsäurepeptid-Derivaten. Die Reaktionsgeschwindigkeit in Dioxan bei 35°, gemessen an der Abnahme der charakteristischen Isocyanatbande bei 2250/cm, ergab für die Umsetzung einer Reihe von Acylhydrazinoessigsäure-Derivaten mit *N*-Carbonyl-alanin-methylester¹¹⁾ bei Einsatz äquimol. Mengen beider Reaktionspartner übereinstimmend 185–210 Sek. für die 50proz. Umsetzung¹²⁾.



	X	R ¹	R ²	R ³
1a	Z-Gly	OC ₂ H ₅	H	OC ₂ H ₅
1b	Z-Gly	NH ₂	H	OC ₂ H ₅
1c	Z-Gly	NH ₂	H	OCH ₃
1d	Z-Gly	NH ₂	CH ₃	OCH ₃
1e	Z-Glu(NH ₂)	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃
2a	Z-Gly	OC(CH ₃) ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	OCH ₃
2b	Z-Gly	OH	CH ₂ C ₆ H ₅	OCH ₃
2c*)	(CH ₃) ₂ C=	NH ₂	H	OC ₂ H ₅

*) X=N statt X-NH.

6) *J. Gante* und *W. Lautsch*, Chem. Ber. **97**, 983, 994 (1964).

7) *J. Gante*, Fortschr. chem. Forsch. **6/2**, 358 (1966).

8) *H. J. Hess*, *W. T. Moreland* und *G. T. Laubach*, J. Amer. chem. Soc. **85**, 4040 (1963).

9) *J. Gante*, Chem. Ber. **98**, 540 (1965).

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

11) *St. Goldschmidt* und *M. Wick*, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 (1952).

12) *H. Niedrich* und *Ch. Berseck*, unveröffentlicht.

Zur Gewinnung von α -Aza-asparaginsäurepeptiden wurde erstmals der aus Halogenessigsäure-tert.-butylester zugängliche, recht labile Hydrazinoessigsäure-tert.-butylester eingesetzt. Von dem Z-Glycyl-hydrazinoessigsäure-tert.-butylester ausgehend, gelangt man nach Addition an den N-Carbonyl-aminosäureester und saurer Verseifung des tert.-Butylesters **2a** zum α -Aza-asparaginsäurepeptid, wie die Synthese von **2b** zeigt. Auf o. g. Weise wurden weiter die Modellpeptide **1a–e** und **2c** dargestellt.

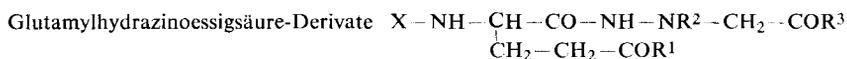
Die α -Aza-asparaginpeptidester mit $R^1 = NH_2$ lassen sich weder verseifen noch in die Hydrazide überführen. Die Struktur der hierbei entstehenden einheitlichen Produkte wurde nicht näher untersucht. Da unter gleichen Bedingungen Azaglycinpeptidester ($X-NH-NH-CO-NH-CHR-CO_2R$)^{6,12)} und ein α -Aza-valinpeptidester⁸⁾ zu den entsprechenden Säuren verseift werden und da Azaglycinpeptid-hydrazide darstellbar sind⁶⁾, muß auf eine Beteiligung der β -Carboxamidgruppe an weiteren Reaktionen im alkalischen Medium geschlossen werden.

Bei der Aufarbeitung geschützter α -Aza-asparaginpeptide macht sich ihre relativ gute Wasserlöslichkeit bemerkbar.

B. Glutamylhydrazinoessigsäure-Derivate

Das für die Herstellung der Oxytocin-Heterosequenz Z-Glu(NH₂)-Azasp(NH₂)-Cys(Bzl)-OR benötigte Z-Glu(NH₂)-hydrazinoacetamid (**5**) wurde, ausgehend von Z-Glu(OCH₃)-NHGly-OCH₃ (**3a**), Z-Glu(NH₂)-NHGly-OCH₃ (**4a**) und Z-Pyroglytamyl-NHGly-OCH₃, entgegen den Befunden mit anderen Acylhydrazinoessigestern¹⁰⁾, durch Einwirkung von NH₃ niemals in Ausbeuten über 10% erhalten.

Hierbei konnte auch die früher gemachte Beobachtung, daß Verseifungen der Estergruppe erst nach Einführung einer Schutzgruppe am α -Stickstoff brauchbare Ausbeuten liefern¹³⁾, bestätigt werden. Versuche zur Verknüpfung von Z-Glutamin mit N²-Boc-Hydrazinoacetamid brachten kein Ergebnis. Allein durch Umsetzung von Z- bzw. Boc-Glutamin[*p*-nitro-phenylester] mit Hydrazinoacetamid¹⁴⁾ konnten **5** und **6** in guter Reinheit und Ausbeute dargestellt werden.



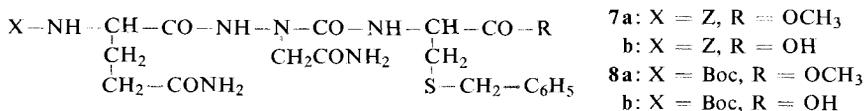
	X	R ¹	R ²	R ³
3a	Z	OCH ₃	H	OCH ₃
3b	Z	OCH ₃	Z	OCH ₃
3c	Z	OH	Z	OH
4a	Z	NH ₂	H	OCH ₃
4b	Z	NH ₂	Z	OCH ₃
4c	Z	NH ₂	Z	OC ₂ H ₅
4d	Z	NH ₂	Z	OH
5	Z	NH ₂	H	NH ₂
6	Boc	NH ₂	H	NH ₂

¹³⁾ H. Niedrich und W. Knobloch, J. prakt. Chem. **17**, 263 (1962).

¹⁴⁾ H. Niedrich, Chem. Ber. **98**, 3451 (1965).

C. Glutaminyl- α -aza-asparaginyl-S-benzyl-cystein-Derivate

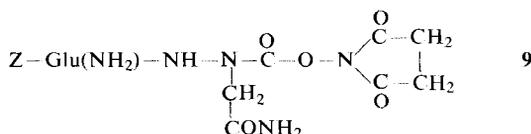
Durch Erhitzen von **5** bzw. **6** mit *N*-Carbonyl-S-benzyl-cystein-methylester¹⁵⁾ in Dioxan wurden **7a** und **8a** gewonnen.



Die Verseifung zu **7b** und **8b** gelang hier mittels Chymotrypsin bei pH 8–8.5¹⁵⁾ mit Ausbeuten von 40–60%.

7b wurde nach verschiedenen Knüpfungsmethoden mit dem Tripeptid Pro-Leu-Gly-NH₂ umgesetzt. Die Dicyclohexylcarbodiimid-Methode ergab ein unreines Aza-asparagin-hexapeptid, dessen Reinigung zu aufwendig und verlustreich war. Die Methode der gemischten Anhydride lieferte ein einheitliches Produkt, das jedoch nicht den geforderten Stickstoffgehalt aufwies. Die Phosphorazo-Methode¹⁶⁾ versagte ebenfalls, obwohl bei der Modellreaktion Pro-Leu-Gly-NH₂ + Z-Cys(Bzl)OH eine Reinausbeute von ca. 20% erhalten wurde. Auch ließ der etwas zu niedrige N-Gehalt der Produkte einen Verlust von NH₃, möglicherweise am Carboxamid-Stickstoff des Azaasparagins, befürchten.

Die Umsetzung des von *Groß* und *Bilk*¹⁷⁾ beschriebenen Chlorameisensäure-[*N*-hydroxy-succinimidester] mit **5** führte sehr glatt zu Z-Glutaminyl- α -aza-asparagin-[*N*-hydroxy-succinimidester] (**9**), der jedoch mit Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂ auch in der Wärme *nicht* reagierte. Beide Ausgangsprodukte wurden wieder isoliert.



Da die von *Gante* dargestellten, vergleichbaren Acyl-azaglycin-[*p*-nitro-phenylester] durch Aminosäureester sehr leicht aminolysiert werden¹⁸⁾, muß man einen Einfluß des β -Amidstickstoffes auf die Polarisierung der Estercarbonylgruppe des Kohlen-säure-hydroxysuccinimidesters diskutieren.

Die hier aufgezeigten Schwierigkeiten veranlaßten uns, einen anderen Syntheseweg einzuschlagen.

D. 2-[α -Aza-asparagin]-tripeptid-[*p*-nitro-phenylester]

Die von *Losse* et al.^{19, 20)} hergestellten *N*-Carbonyl-aminosäure-[*p*-nitro-phenyl-ester] reagieren mit geschützten Aminoacyl-hydrazinoacetamiden sehr glatt und in guten Ausbeuten zu **10–12**.

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

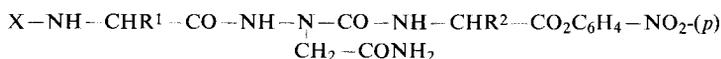
¹⁶⁾ W. Grassmann und E. Wünsch, Chem. Ber. **91**, 449 (1958).

¹⁷⁾ H. Groß und L. Bilk, Angew. Chem. **79**, 532 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. **6**, 570 (1967).

¹⁸⁾ J. Gante, Chem. Ber. **98**, 3334 (1965).

¹⁹⁾ G. Losse und H. Vietmeyer, J. prakt. Chem. **32**, 204 (1966).

²⁰⁾ G. Losse und W. Gödicke, Chem. Ber. **100**, 3314 (1967).



X	R ¹	R ²	resultierende Kurzformel
10	Z	H	Z-Gly-Azasp(NH ₂)-Gly-ONp
11	Boc	-[CH ₂] ₄ -NH-Boc	Boc-Lys(Boc)-Azasp(NH ₂)-Ala-ONp
12	Boc	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	Boc-Glu(NH ₂)-Azasp(NH ₂)-Cys(Bzl)-ONp

Die Addition der Acylhydrazinoessigsäure-Derivate an die *N*-Carbonyl-aminosäure-*[p*-nitro-phenylester] läuft ca. 3 mal schneller ab als bei den -äthylestern¹²⁾ (45–55 Sek. für 50% Umsatz), so daß für die Umsetzung zu **10**, **11** und **12** mildere Reaktionsbedingungen angewandt werden konnten. **11** war bisher nicht kristallin zu erhalten. Das zu seiner Herstellung notwendige Boc-Lys(Boc)-NHGlyNH₂ wurde auf die gleiche Weise wie **6** dargestellt.

Da erfahrungsgemäß längerdauernde Reaktionen im alkalischen Medium bei den Azaasparagin-Peptiden zu bisher nicht geklärten Nebenreaktionen führen (vgl. auch Kapitel A), wurde zur Ermittlung der günstigsten Bedingungen für die Umsetzung mit Peptidestern die Kinetik der Aminolyse von **10** und **12** untersucht. Als Base diente Benzylamin, einmal in 100fachem Überschuß zur Erreichung einer Reaktion pseudoerster Ordnung (vgl. auch i.c.^{21, 22)}, andererseits in 2fachem Überschuß zur Ermittlung des reaktionsbeschleunigenden Einflusses von 1.2.4-Triazol^{23, 24}.

Sowohl bei 100fachem als auch bei 2fachem Aminüberschuß reagieren **10** und **12** 3–4 mal schneller als Z-Gly-ONp bzw. Z-Cys(Bzl)-ONp. 1.2.4-Triazol beschleunigt die Aminolyse von **10** und **12** im Gegensatz zu Z-Gly-ONp und Z-Cys(Bzl)-ONp erst in äquimolaren Mengen und nur in geringem Maße (Tab.).

Reaktivität der α -Aza-asparagin-tripeptid-nitrophenylester

Substanz	Halbwertszeit	50% Umsatz	50% Umsatz, 2 Äquiv. BzlNH ₂		
	100 Äquiv. BzlNH ₂ [Sek.]	2 Äquiv. BzlNH ₂ [Min.]	0.4 Äquiv. BzlNH ₂	1.2.4-Triazol 2 Äquiv. [Min.]	10 Äquiv.
10	44	5.6	5.1	4.6	4.5
Z-Gly-ONp	192	19.2	18.8	13.1	10.1
12	78	9.9	9.9	9.9	8.0
Z-Cys(Bzl)-ONp	234	22.5	21.0	19.5	13.2

Die Reaktionen wurden in 80proz. Dioxan bei 25° mit 5·10⁻⁵ m Nitrophenylester durchgeführt und die Zunahme der Nitrophenolbande mit dem Unicam SP 700 verfolgt.

²¹⁾ J. Pless und R. A. Boissonas, Helv. chim. Acta **46**, 1609 (1963).

²²⁾ H.-D. Jakubke und A. Voigt, Chem. Ber. **99**, 2419 (1966).

²³⁾ H. C. Beyerman und W. Maassen van den Brink, Proc. chem. Soc. [London] **1963**, 266.

²⁴⁾ H. C. Beyerman, C. A. M. Boers-Boonekamp und H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **87**, 257 (1968).

Bei der Umsetzung von **10** mit Phenylalanin-methylester wurde das Tetrapeptid Z-Gly-Azasp(NH₂)-Gly-Phe-OCH₃ erhalten. Die Umsetzung von **12** mit Pro-Leu-

Boc-Glu(NH₂)-Azasp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂ **13**

Gly-NH₂ führte mit 80% Ausbeute zu einem einheitlichen Produkt mit geringem Stickstoff-Defizit. In 56proz. Ausbeute wurde **13** mit korrekten Analysenwerten gewonnen. Über die Umsetzung zum 5-Azaasparagin-Oxytocin wird an anderer Stelle berichtet.

Die Mikroelementaranalysen wurden von Frau *N. Smirnowa* und Fräulein *U. Wowczek* angefertigt. Für zuverlässige technische Mitarbeit sei Herrn *J. Pirwitz*, für die Durchführung kinetischer Messungen Herrn *B. Baeck* gedankt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheitzisch nach Boetius bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenproben trockneten wir 5–8 Stdn. bei 50 bzw. 70° und 0.1 Torr. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurden alle Verbindungen in Ameisensäure/Essigsäure bei pH 2 und Pyridin/Acetatpuffer vom pH 4.2 bzw. 5.6 elektrophoretisch geprüft und, wenn nicht anders vermerkt, als hinreichend einheitlich befunden.

Die „übliche Aufarbeitung“ umfaßt a) Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer (DMF bei 50°/3 Torr), b) Lösen in organischer Phase, c) Ausschütteln mit 2*n* HCl oder 10proz. Citronensäure (bei säurelabilen Produkten), mit KHCO₃-Lösung und Wasser, d) Trocknen über MgSO₄ und e) wie a).

Die [α]-Werte sind mit dem lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Bellingham & Stanley bestimmt und können um 0.5–1° vom angegebenen Wert abweichen.

A. α-Aza-asparaginsäurepeptid-Derivate

Benzylloxycarbonyl-glycyl-α-aza-aspartyl(β-äthylester)-glycin-äthylester (1a): Man erhitzt 620 mg (2 mMol) *N*^β-[*Benzylloxycarbonyl-glycyl*]-hydrazinoessigsäure-äthylester¹⁰ in 2 ccm Dioxan mit 290 mg *Isocyanatoessigsäure-äthylester*¹¹ 10 Min. auf 80°. Der nach Entfernen des Dioxans i. Vak. verbleibende Rückstand wird mit Äther kristallin gerieben. 850 mg (97%), Schmp. 145–147°. Die Reinigung erfolgt durch Lösen in heißem Essigester und Zugabe des 3–4fachen Volumens Äther.

C₁₉H₂₆N₄O₈ (438.5) Ber. C 52.05 H 5.98 N 12.78 Gef. C 51.97 H 5.87 N 13.03

Benzylloxycarbonyl-glycyl-α-aza-asparaginyll-glycin-äthylester (1b): 560 mg (2 mMol) *Z-Gly-NHGly-NH₂*¹⁰ werden wie bei **1a** umgesetzt, der Rückstand mit Äthanol kristallin gerieben und aus absol. Äthanol umkristallisiert. 680 mg (83%), Schmp. 146–148°.

C₁₇H₂₃N₅O₇ (409.4) Ber. C 49.87 H 5.66 N 17.11 Gef. C 49.91 H 5.71 N 17.38

Benzylloxycarbonyl-glycyl-α-aza-asparaginyll-glycin-methylester (1c): 5.6 g (20 mMol) *Z-Gly-NHGly-NH₂* werden in Dioxan (40 ccm) suspendiert und mit 50 ccm einer ca. 10proz. Lösung von *Isocyanatoessigsäure-methylester* in Toluol unter Rückfluß gekocht, bis sich alles gelöst hat. Die Lösung wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und wie bei **1b** aufgearbeitet. 6.45 g (81%), Schmp. 159–163°. Nach zweimaliger Kristallisation aus Äthanol Schmp. 166–168°.

C₁₆H₂₁N₅O₇ (395.4) Ber. C 48.61 H 5.35 N 17.71 Gef. C 48.70 H 5.35 N 17.69

Hydrazinolyse und Verseifung von 1c: Bei Behandlung mit *Hydrazinhydrat* kristallisierte nach Äthanolzugabe mit ca. 90% Ausb. ein Produkt mit Schmp. 127–130° aus, dessen Reinigung stets mit Zers. verbunden war. Das Mol.-Gew. wurde in Dimethylsulfoxid zu 256 bestimmt. Gef. C 42.44 H 5.67 N 26.73.

Die Verseifung bei pH 10 am pH-Statens ergab ein Produkt mit Schmp. 149–150°, Gef. N 16.94, das ebenfalls nicht identifiziert wurde.

Benzoyloxycarbonyl-glycyl- α -aza-asparaginyll-L-alanin-methylester (1d): Die Darstellung erfolgt wie bei **1a**, Ausb. ca. 60%, Schmp. 75–78°.

C₁₇H₂₃N₅O₇ (409.4) Ber. C 49.87 H 5.66 N 17.11 Gef. C 49.70 H 5.68 N 16.62

Benzoyloxycarbonyl-glutaminyl- α -aza-aspartyl(β -methylester)-L-alanin-methylester (1e): Die Darstellung erfolgt aus **4a** und *α -Isocyanato-propionsäure-methylester* wie bei **1a**, Ausb. 73%, Schmp. 122–125°.

C₂₁H₂₉N₅O₉ (495.5) Ber. C 50.90 H 5.90 N 14.14 Gef. C 51.06 H 6.16 N 14.06

Isopropyliden- α -aza-asparaginyll-glycin-äthylester (2c): 650 mg (5 mMol) *N ^{β} -Isopropyliden-hydrazinoacetamid*¹⁴) in 5 ccm Dioxan werden mit 700 mg *Isocyanatoessigsäure-äthylester* versetzt, die erwärmte Lösung noch 3 Min. auf 80° erhitzt und wie bei **1a** aufgearbeitet. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Wasser Ausb. 790 mg (61%), Schmp. 200–203°. Analysenprobe aus Nitromethan: Schmp. 212–215°.

C₁₈H₁₈N₄O₄ (258.3) Ber. C 46.50 H 7.03 N 21.69 Gef. C 46.57 H 7.29 N 21.82

Hydrazinoessigsäure-tert.-butylester: 29.3 g (0.15 Mol) *Bromessigsäure-tert.-butylester*²⁵) werden unter Kühlung und Rühren zu einem Gemisch von 50 ccm 70proz. *Hydrazinhydrat* in 200 ccm Äthanol getropft. Die Temp. soll 25° nicht übersteigen. Die Lösung darf sich nicht trüben (evtl. etwas mehr Äthanol zusetzen). Man erwärmt noch 2 Stdn. auf 45–50°, entfernt Äthanol i. Vak. und trennt die Phasen. Die wäbr. Phase wird zweimal mit Chloroform extrahiert. Man vereinigt die Auszüge mit der oberen Phase, trennt von Ausscheidungen ab und schüttelt 10 Min. mit MgSO₄ durch. Nach Entfernen des Chloroforms wird an der Ölpumpe destilliert. In der mit Trockeneis gekühlten Vorlage erstarrt das Produkt sofort. Ausb. 12.3 g (56%), Sdp.₁ 62–64°, Schmp. 24–25°, n_D^{20} 1.4421. Die Aufbewahrung erfolgt unter Trockeneis-Temp., da das Produkt sich auch im Tiefkühlschrank langsam zersetzt, wobei der N-Gehalt abnimmt (nach 14 Tagen ca. 12% N).

C₆H₁₄N₂O₂ (146.2) Ber. N 19.16 Gef. N 17.7

Die Gehaltsbestimmung erfolgt durch Erwärmen in methanol. HCl-Lösung und Ausfällen des entstandenen Hydrazinoessigsäure-methylester-hydrochlorids mit Äther nach 2–3 Stdn.

o-Hydroxy-benzyliden-Derivat: Äquimolare Mengen *Salicylaldehyd* und des vorstehend erhaltenen *H-NHGLy-OtBu* werden 30 Min. auf 100° erhitzt, in wenig Äther gelöst und mit Hexan bis zur Trübung versetzt. Nach 2 Tagen ist das Derivat auskristallisiert. Aus n-Hexan Schmp. 78–80°.

C₁₃H₁₈N₂O₃ (250.3) Ber. C 62.38 H 7.25 N 11.19 Gef. C 62.35 H 7.40 N 11.44

N ^{β} -[Benzoyloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure-tert.-butylester: 1.75 g (12 mMol) *Hydrazinoessigsäure-tert.-butylester* in 20 ccm Essigsäure-äthylester werden mit 2.5 g (10 mMol) *Benzoyloxycarbonyl-glycin-cyanmethylester* versetzt. Nach 24 Stdn. bei Raumtemp. wird von wenig ausgeschiedenen Kristallen dekantiert und wie üblich aufgearbeitet. Ausb. 3.6 g Sirup (ca. 80%). Die Verbindung kann man kristallisiert erhalten, wenn man in wenig Äthanol löst, Äther und Hexan zugibt und eindunsten läßt. Schmp. 117–121°.

C₁₇H₂₃N₃O₅ (349.4) Ber. C 58.44 H 6.64 N 12.03 Gef. C 58.64 H 6.72 N 12.13

²⁵) B. Abramovitch, J. C. Shivers, B. E. Hudson und C. R. Hauser, J. Amer. chem. Soc. **65**, 986 (1943).

Benzylloxycarbonyl-glycyl- α -aza-aspartyl(β -tert.-butylester)-L-phenylalanin-methylester (2a): 1.4 g des sirupösen *Z-Gly-NHGly-OtBu* in 10 ccm absol. Dioxan werden mit 825 mg (4 mMol) *N-Carbonyl-L-phenylalanin-methylester* versetzt. Unter Selbsterwärmung tritt Reaktion ein, wobei 30° nicht überschritten werden sollen. Nach 3 Stdn. wird Dioxan i. Vak. entfernt, der Rückstand mit Hexan verrieben und in einem Gemisch von Äther und Hexan zur Kristallisation gebracht. 1.36 g (63%), Schmp. 114–115°, $[\alpha]_D^{20}$: -7.9° ($c = 1$ in DMF).

$C_{27}H_{34}N_4O_8$ (542.6) Ber. C 59.77 H 6.32 N 10.32 Gef. C 59.89 H 6.45 N 10.20

Benzylloxycarbonyl-glycyl- α -aza- α -aspartyl-L-phenylalanin-methylester (2b): In eine Lösung von 542 mg (1 mMol) **2a** in 8 ccm Eisessig leitet man 30 Min. *HCl* ein und entfernt den Eisessig nach 2 Stdn. i. Vak. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, das *Azaasparaginsäure-peptid* in $NaHCO_3$ -Lösung übernommen und nach Ansäuern der wäbr. Phase auf pH 2 mit Essigester extrahiert. Der nunmehr verbleibende Rückstand wird erst mit Äther, dann mit Hexan festgerieben. Ausb. 295 mg (60%). Titration der CO_2H -Gruppe ergab das Mol.-Gew. 478.

$C_{23}H_{26}N_4O_8$ (486.5) Ber. C 56.78 H 5.39 N 11.52 Gef. C 56.38 H 5.69 N 11.29

B. Glutamylhydrazinoessigsäure-Derivate

N β -[Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -methylester)]-hydrazinoessigsäure-methylester (3a): 12.45 g *Z-Glu(OCH $_3$)-OH* (40 mMol) und 5.1 g (50 mMol) frisch dest. *Hydrazinoessigsäure-methylester* in 80 ccm absol. Dioxan werden unter Eiskühlung mit 8.3 g *DCCI* versetzt. Nach 12 Stdn. bei Raumtemp. fügt man 0.5 ccm Eisessig hinzu und arbeitet nach 30 Min. wie üblich auf. Der erhaltene Sirup kristallisiert beim Verreiben mit Äther/Hexan. Ausb. 9.9 g (65%), Schmp. 73–76° (nach Lösen in Essigester und Zugeben von Hexan). $[\alpha]_D^{20}$: -7.8° ($c = 1$ in DMF).

$C_{17}H_{23}N_3O_7$ (381.4) Ber. C 53.54 H 6.08 N 11.02 Gef. C 53.58 H 6.10 N 11.43

N β -[Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -methylester)]-N $^\alpha$ -benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-methylester (3b): Zu einem Gemisch von 1.75 g *KHCO $_3$* , 1.2 ccm *Chlorameisensäurebenzylester*, 150 ccm Wasser und 50 ccm Äther (mittels Vibromischer stark emulgiert) tropft man in 1 Stde. 2.5 g (6.5 mMol) **3a** in 50 ccm DMF. Nach 3 Stdn. kräftiger Durchmischung extrahiert man 4mal mit Essigester, arbeitet wie üblich auf und erhält nach Verreiben mit Äther 1.03 g **3b** (30%), Schmp. 98–102°.

$C_{25}H_{29}N_3O_9$ (515.5) Ber. C 58.25 H 5.67 N 8.15 Gef. C 58.16 H 5.55 N 8.33

N β -[Benzylloxycarbonyl-L- α -glutamyl]-N $^\alpha$ -benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure (3c): Zu 260 mg (0.5 mMol) **3b** in 20 ccm Methanol werden 40 mg *NaOH* in 5 ccm Wasser gegeben. Nach 2 Stdn. wird i. Vak. bis zur Trockne eingengt, in Wasser gelöst, filtriert und auf pH 2 angesäuert. Über Nacht kristallisieren aus der trüben Lösung 210 mg (85%), Schmp. 163 bis 171°. Aus Nitromethan Schmp. 175–178°.

$C_{23}H_{25}N_3O_9$ (487.5) Ber. C 56.67 H 5.17 N 8.62 Gef. C 56.75 H 5.16 N 8.58

N β -[Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl]-hydrazinoessigsäure-methylester (4a): 6.35 g (45 mMol) *H-NHGly-OCH $_3$ ·HCl* werden unter Zugabe von 6.33 ccm *Triäthylamin* in 150 ccm Chloroform gelöst. Nach Filtrieren werden 12.03 g (30 mMol) *Z-Glu(NH $_2$)-ONp* sowie einige Tropfen Eisessig zugegeben und durch Zufügen von weiterem Chloroform (ca. 80 ccm) und kräftiges Schütteln (30 Min.) eine klare Lösung erzielt. Nach 24 Stdn. wird i. Vak. auf ein Drittel eingengt, nach weiteren 24 Stdn. vom ausgeschiedenen Kristallbrei abgesaugt, dieser mit Chloroform gewaschen und getrocknet. Rohausb. 9.1 g (82%), Schmp. 170–177°.

Aus Wasser 8.0 g (72%), Schmp. 192–194°, aus Methanol Schmp. 195–196°. $[\alpha]_D^{20}$: -7.7° ($c = 1$ in DMF).

$C_{16}H_{22}N_4O_6$ (366.4) Ber. C 52.45 H 6.05 N 15.29 Gef. C 52.44 H 5.98 N 15.40

N^β -[Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl]- N^α -benzyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-methylester (**4b**): 7.3 g (20 mMol) **4a** in 200 ccm DMF werden, wie bei **3b** beschrieben, umgesetzt. Dauer der Zugabe 3 Stdn. Man saugt von dem fein ausgeschiedenen Produkt ab und wäscht mit Äther nach. Ausb. 4.85 g (49%), Schmp. 167–171°, aus Methanol/Wasser Schmp. 173–175°. $[\alpha]_D^{20}$: -3.0° ($c = 1$ in DMF).

$C_{24}H_{28}N_4O_8$ (500.5) Ber. C 57.59 H 5.64 N 11.20 Gef. C 57.77 H 5.65 N 11.32

N^β -[Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl]- N^α -benzyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (**4c**): 2.8 g *Z*-Glu(NH₂)-OH werden in 10 ccm DMF unter Zusatz von 1.4 ccm *N*-Äthylpiperidin gelöst. Bei -10° werden 1.2 ccm Chlorameisensäure-*sek*-butylester zugesetzt, und in 5 Min. bei -5° bildet sich das Anhydrid. Bei -30° gibt man 2.5 g N^α -*Z*-NHGly-OÄt in 12 ccm Chloroform hinzu, beläßt 30 Min. bei -5° und 3 Stdn. bei Raumtemp., nimmt in mehr Chloroform auf und arbeitet wie üblich auf. Mit Äther verrieben, erhält man 1.45 g (28%) **4c**, Schmp. 156–163°. Nach Lösen in Äthanol und Fällen mit Äther und Hexan Schmp. 169–171°.

$C_{25}H_{30}N_4O_8$ (514.6) Ber. C 58.36 H 5.88 N 10.89 Gef. C 58.43 H 5.83 N 11.12

N^β -[Benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl]- N^α -benzyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure (**4d**): Zur Lösung von 2.0 g (4 mMol) **4b** in 200 ccm warmem Methanol gibt man 50 ccm Wasser und tropft bei Raumtemp. in 1 Stde. 44 ccm 0.1 *n* NaOH hinzu. Die Lösung wird filtriert, i. Vak. auf ca. 80 ccm konzentriert und mit HCl angesäuert. Der Sirup kristallisiert beim Verreiben. Rohausb. 1.55 g, Schmp. 108–115°. Aus Nitromethan verbleiben 920 mg (47%), Schmp. 145–149°. Die Analysenprobe, nochmals aus Nitromethan umkristallisiert, schmolz bei 150–152°. $[\alpha]_D^{20}$: -2.2° ($c = 1$ in DMF).

$C_{23}H_{26}N_4O_8$ (486.5) Ber. C 56.78 H 5.38 N 11.52 Gef. C 56.81 H 5.53 N 11.40

N^β -[Benzyloxycarbonyl-*L*-pyroglutaminyl]-hydrazinoessigsäure-methylester: 1.08 g (7.8 mMol) *H*-NHGly-OCH₃ · HCl werden in 25 ccm Chloroform unter Zusatz von 1.08 ccm Triäthylamin gelöst. Nach Filtration und Zugabe von 2.0 g (5.2 mMol) Benzyloxycarbonyl-*L*-pyroglutaminsäure-[*p*-nitro-phenylester]²⁶⁾ wird mit Essigsäure auf pH 5–6 eingestellt und 48 Stdn. im Dunkeln aufbewahrt. Man verdünnt mit 80 ccm Chloroform, schüttelt viermal mit *n* Ammoniaklösung und arbeitet weiter wie üblich auf. Der Rückstand (1.25 g, 69.5%), Schmp. 137–144° wird zweimal aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 146–148°. $[\alpha]_D^{20}$: -1° ($c = 1$ in DMF).

$C_{16}H_{19}N_3O_6$ (349.4) Ber. C 55.01 H 5.48 N 12.02 Gef. C 54.84 H 5.46 N 12.03

N^α -*tert*-Butyloxycarbonyl-hydrazinoacetamid: Zur Lösung von 2.17 g N^α -*tert*-Butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester in 80 ccm mit NH₃ gesätt. Methanol gibt man 100 mg 1.2.4-Triazol und läßt 5 Tage stehen. Der nach Entfernen des Methanols i. Vak. verbleibende Sirup kristallisiert beim Verreiben mit Äther. Ausb. 1.56 g (83%). Aus Nitromethan Schmp. 164–166°.

$C_7H_{15}N_3O_3$ (189.2) Ber. C 44.43 H 7.99 N 22.21 Gef. C 44.16 H 8.11 N 22.26

Eine N^β -Anknüpfung von *Z*-Glu(NH₂) mittels DCCl und über das gemischte Anhydrid gelang nicht.

²⁶⁾ H. Gibian und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. **640**, 145 (1961).

N^β-[Benzyloxycarbonyl-L-glutaminy]l-hydrazinoacetamid (5)

a) Ausgehend von **3a** und **4a** konnten durch Behandlung mit Methanol/*Ammoniak* trotz Variation der Einwirkungszeit (8–72 Stdn.), der Temperatur (0–40°) und der Verdünnung (Zutropf-Methode) niemals mehr als 10% Ausb. erzielt werden. Zur Isolierung des reinen Produktes aus der salbenartigen Masse war mindestens dreimaliges Umkristallisieren aus Wasser notwendig, wobei das Diamid nach 3–5 Tagen auskristallisierte; Schmp. 237–238°, polymorph mit dem nach b) dargestellten **5**.

C₁₅H₂₁N₅O₅ (351.4) Ber. C 51.28 H 6.02 N 19.93 a) Gef. C 51.17 H 5.74 N 19.86
b) Gef. C 51.32 H 6.24 N 20.16

b) 8.02 g (20 mMol) *Z-Glu(NH₂)-ONp* werden zu einer kräftig gerührten Mischung von 3.3 g *H-NHGl_y-NH₂·HCl*, 3.65 ccm *Triäthylamin* und 1 ccm Eisessig in 40 ccm DMF gegeben. Nachdem sich der Nitrophenylester gelöst hat, beläßt man 40 Stdn. bei Raumtemp. Nach ca. 10 Stdn. beginnt sich ein Niederschlag auszuschcheiden. Man verrührt mit ca. 150 ccm Äther, saugt ab, wäscht den Niederschlag mit 60 ccm Äthanol/Wasser (4:1) und zweimal mit je 40 ccm Äthanol und erhält ca. 5 g, Schmp. 170–180°. Aus Äthanol (400–500 ccm) Ausb. 4.1 g (58%) farblose Kristalle, Schmp. 190–191°. [α]_D²⁰: –4.3° (c = 1 in DMF).

N^β-[*tert*-Butyloxycarbonyl-L-glutaminy]l-hydrazinoacetamid (**6**): 5.5 g (15 mMol) *Boc-Glu(NH₂)-ONp* werden, wie bei **5** beschrieben, umgesetzt. Nach Entfernen des Triäthylaminhydrochlorids wird **6** durch Ätherzugabe aus dem Filtrat ausgefällt. Der sirupöse Niederschlag kristallisiert beim Verreiben mit Äthanol. Rohausb. 4.3 g, Schmp. 158–162°. Aus ca. 150 ccm Äthanol Ausb. 3.05 g (64%), Schmp. 172–173°. [α]_D²⁰: –13.2° (c = 0.5 in DMF).

C₁₂H₂₃N₅O₅ (317.4) Ber. C 45.42 H 7.31 N 22.07 Gef. C 45.37 H 7.49 N 22.34

C. Glutaminy-α-aza-asparaginy-S-benzyl-cystein-Derivate

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-α-aza-asparaginy-S-benzyl-L-cystein-methylester (**7a**): 1.05 g (3 mMol) **5** werden feingepulvert in 20 ccm siedendes Dioxan gegeben. Nach Zugabe von 0.9–1.0 g *N-Carbonyl-S-benzyl-L-cystein-methylester* erhitzt man noch ca. 30 Min. auf siedendem Wasserbad, bis sich alles gelöst hat. Dann wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in wasserhaltigem Äthanol gelöst, vom ausgeschiedenen Niederschlag (ca. 100 mg) abgesaugt und zur Trockne gebracht. Das amorphe Produkt zeigt einen Schmelzbereich von 70–80° und zerfließt beim Aufbewahren. Ausb. 1.73 g (96%).

C₂₇H₃₄N₆O₈S (602.7) Ber. C 53.81 H 5.68 N 13.95 Gef. C 53.80 H 5.91 N 14.01

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-α-aza-asparaginy-S-benzyl-L-cystein (**7b**): 602 mg (1 mMol) **7a** in 10 ccm DMF werden zu einer Lösung von 15 mg krist. *Chymotrypsin* in 25 ccm Wasser gegeben und am pH-Staten bei pH 8–8.5 und 37° verseift. Nach 20–24 Stdn. sind ca. 0.9 ccm *n* NaOH aufgenommen. Das Gemisch wird auf pH 9 gebracht, mit Wasser verdünnt, dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt und über Kieselgur klarfiltriert. Mit HCl säuert man auf pH 2 an, sättigt mit NaCl und schüttelt dreimal mit Essigester aus. Ein Teil der *Azatripepidsäure* kann sich hierbei kristallin ausscheiden. Nach Entfernen des Essigesters i. Vak. wird der Rückstand zusammen mit dem Niederschlag in 30 ccm Äthanol aufgenommen, die Lösung filtriert und eingengt. Aus ca. 5 ccm Äthanol fallen auf Zugabe von Äther in 2–3 Tagen 375 mg **7b** aus. Ausb. 63%, Schmp. 155–159°. Das Produkt ist rein genug zur Weiterverarbeitung. [α]_D²⁰: –28.4° (c = 0.5 in DMF). Man löst in 7.5 ccm siedendem Äthanol, kühlt ab, dekantiert vom ausgeschiedenen Öl und versetzt den klaren Überstand mit 25 ccm Äther. Die nach 2 Tagen ausgeschiedenen Nadeln haben den Schmp. 182–185°. Die Reinigung ist verlustreich.

C₂₆H₃₂N₆O₈S (588.6) Ber. C 53.05 H 5.48 N 14.28 Gef. C 52.87 H 5.64 N 14.14

tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyll- α -aza-asparaginyll-S-benzyl-L-cystein-methylester (8a): Aus 0.96 g (3 mMol) **6** werden, wie bei **7a** beschrieben, 1.6 g **8a** (94%) amorphes Produkt erhalten. Schmelzbereich 45–55°.

$C_{24}H_{36}N_6O_8S$ (568.7) Ber. C 50.69 H 6.38 N 14.78 S 5.64
Gef. C 50.53 H 6.09 N 14.64 S 6.08

tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyll- α -aza-asparaginyll-S-benzyl-L-cystein (8b): 570 mg **8a** werden wie **7a** in 8 ccm DMF und 80 ccm Wasser verseift. Man säuert mit Ameisensäure an, sättigt mit NaCl und extrahiert mit n-Butanol. Das amorphe Endprodukt enthält NaCl und wird daher in absol. Äthanol aufgenommen, die Lösung filtriert, i. Vak. eingengt und der Rückstand mit Äther festgerieben. Schmelzbereich 80–100°.

$C_{23}H_{34}N_6O_8S$ (554.6) Ber. C 49.81 H 6.18 N 15.15
Gef. C 49.36 H 6.20 N 14.83 Mol.-Gew. 570 (Titration)

Benzylloxycarbonyl-L-glutaminyll- α -aza-asparagin-[N-hydroxy-succinimidester] (9) (N^B-[Benzylloxycarbonyl-L-glutaminyll-N ^{α} -succinimidooxycarbonyl-hydrazinoacetamid): Eine Lösung von 352 mg (1 mMol) **5** in 25 ccm warmem absol. Pyridin wird bei 0° mit 0.2 ccm Chlorameisensäure-[N-hydroxy-succinimidester]¹⁷⁾ versetzt. Nach 3 Stdn. wird das Pyridin i. Vak. entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Citronensäure auf pH 3 gebracht. Man sättigt mit MgSO₄, bringt mit KHCO₃ auf pH 5–6 und extrahiert zweimal mit 10 ccm Methylenchlorid. Nach einigen Stdn. sind 330 mg (67%) auskristallisiert, Schmp. 165–170°. Aus Äthanol Schmp. 163–164°.

$C_{20}H_{24}N_6O_9$ (492.5) Ber. C 48.78 H 4.91 N 17.07 Gef. C 48.87 H 5.15 N 17.06

Versuche zur Umsetzung von 7b mit Pro-Leu-Gly-NH₂: Mittels DCCI unter Zusatz von N-Hydroxy-succinimid wurden aus 350 mg **7b** in DMF 230 mg eines Produktes erhalten, das nach Behandlung mit HBr/Eisessig elektrophoretisch in 3 Komponenten getrennt wurde. Im Pyridinacetat-Puffer vom pH 5.6 tritt während der Elektrophorese die Bildung einer langsamer wandernden Komponente (Freisetzung einer CO₂H-Gruppe?) auf. Durch präparative Elektrophorese wurden 90 mg eines einheitlichen Lyophilisats erhalten, dessen N-Wert jedoch 14.4% tiefer lag als für H-Glu(NH₂)-Azasp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂-acetat-dihydrat berechnet.

Ber. C 48.55 H 6.90 N 17.14 Gef. C 48.38 H 6.96 N 14.67

Bei der Behandlung mit HBr/Eisessig trat erhebliche Hydrolyse an den Carboxamidgruppen ein, weshalb bei den weiteren Versuchen die Boc-Schutzgruppe bevorzugt wurde.

Ausgehend von 227 mg (0.5 mMol) **8b** und 0.06 ccm Chlorameisensäure-*sek.-butylester* wurde das gemischte Anhydrid hergestellt und mit Pro-Leu-Gly-NH₂ umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 280 mg amorphes Produkt (85%), das zwar elektrophoretisch einheitlich war, aber ebenfalls einen um 12% zu niedrigen N-Wert hatte.

D. 2-[α -Aza-asparagin]-tripeptid-[p-nitro-phenylester]

Benzylloxycarbonyl-glycyl- α -aza-asparaginyll-glycin-[p-nitro-phenylester] (10): Die Lösung von 1.4 g (5 mMol) Z-Gly-NHGly-NH₂ in 50 ccm warmem Dioxan wird schnell abgekühlt, 1.3 g N-Carbonyl-glycin-[p-nitro-phenylester]¹⁹⁾ werden zugegeben und der Ansatz bei 70° kräftig geschüttelt. Falls das Isocyanat Verunreinigungen enthält, gibt man mehr hinzu, bis sich Z-Gly-NHGly-NH₂ völlig gelöst hat. Als bald beginnt die Ausscheidung von **10**. Man beläßt die Mischung 2 Stdn. im Kühlschrank, saugt ab und wäscht mit wenig Dioxan nach. Rohausb. 2.4 g (95%), Schmp. 188–189°. Aus absol. Äthanol (ca. 1 l) Ausb. 1.75 g (70%), Schmp. 190–191°.

$C_{21}H_{22}N_6O_9$ (502.5) Ber. C 50.20 H 4.41 N 16.73 Gef. C 49.97 H 4.30 N 16.94

Benzoyloxycarbonyl-glycyl- α -aza-asparaginyll-glycyl-L-phenylalanin-methylester: 1.04g (2mMol) **10** werden bei 0° zu einer Lösung von 900 mg *Phe-OCH₃·HCl* + 0.5 ccm *N-Äthyl-piperidin* in 3 ccm DMF gegeben. Man läßt langsam auf Raumtemp. kommen. Nach einem Tag ist die Lösung klar, nach 2 Tagen wird wie üblich aufgearbeitet. Beim Schütteln scheidet sich im Essigester ein kristalliner Niederschlag aus, 985 mg, Schmp. 133–137°. Zur Entfernung von hartnäckig anhaftendem Nitrophenol chromatographiert man in wenig Methanol an einer kurzen Säule von Sephadex-LH 20. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Er kristallisiert erst auf Zugabe von ein paar Tropfen Wasser. Reinausb. 810 mg (76%), Schmp. 135–140°. Beim Trocknen bei 60° i. Vak. zerfließt die Verbindung. $[\alpha]_D^{20}$: -1.7° ($c = 1$ in DMF).

$C_{24}H_{30}N_6O_8$ (530.5) Ber. C 54.33 H 5.97 N 15.84 Gef. C 54.04 H 5.68 N 15.77

N^β-[N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl]-hydrazinoacetamid: 4.7 g (10 mMol) *Boc-Lys(Boc)-ONp* werden unter Rühren zu einer Mischung von 1.25 g *Hydrazinoacetamidhydrochlorid*, 1.4 ccm *Triäthylamin* und 0.1 ccm Eisessig gegeben. Man läßt die Lösung 3 Tage bei Raumtemp. stehen und arbeitet wie üblich auf. Nitrophenol wird dabei durch Schütteln (4mal) mit ca. 2*n* NH₃ in gesätt. NaCl-Lösung entfernt. Der Rückstand wird mit Äther kristallin gerieben, 3.4 g, Schmp. 114–117°. Aus Nitromethan 2.28 g (55%), Schmp. 130–131°. $[\alpha]_D^{20}$: -13.8° ($c = 1$ in DMF).

$C_{18}H_{35}N_5O_6$ (417.5) Ber. C 51.78 H 8.45 N 16.77 Gef. C 51.50 H 8.49 N 16.68

N,N'-Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl- α -aza-asparaginyll-L-alanin-[p-nitro-phenylester] (**11**): 417 mg *Boc-Lys(Boc)-NHGly-NH₂* in 7 ccm Dioxan werden mit 280 mg *N-Carbonyl-L-alanin-[p-nitro-phenylester]*¹⁹⁾ 3 Stdn. auf 40° erwärmt. Man entfernt das Dioxan i. Vak. und reibt den Rückstand mit n-Hexan fest, 690 mg. Eine Reinigung gelingt durch Lösen in Äther und Ausfällen mit n-Hexan. Im ätherunlöslichen Anteil reichern sich die Nebenprodukte an. Das Produkt zeigt in der Elektrophorese noch eine geringfügige Verunreinigung. Schmelzbereich 65–75°, Ausb. ca. 350 mg.

$C_{28}H_{43}N_7O_{11}$ (653.7) Ber. C 51.45 H 6.63 N 15.00 Gef. C 51.42 H 7.00 N 15.05

tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyll- α -aza-asparaginyll-S-benzyl-L-cystein-[p-nitro-phenylester] (**12**): 1.59 g (5 mMol) **6** werden in 20 ccm absol. Dioxan aufgeschlämmt und mit 1.8 g *N-Carbonyl-S-benzyl-L-cystein-[p-nitro-phenylester]*²⁰⁾ 24 Stdn. bei 40–45° kräftig geschüttelt. Man saugt von ungelösten Anteilen ab und entfernt das Dioxan i. Vak. Die Lösung des Sirups in 25 ccm Äthanol und 1 ccm Wasser wird nach 30 Min. vom ausgeschiedenen Niederschlag abgesaugt (ca. 300 mg) und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird mit Äther festgerieben. Man löst in 10 ccm Methanol, gibt 30–40 ccm Äther bis zur beginnenden Trübung hinzu, rührt 3–5 Stdn. und beläßt über Nacht im Kühlschrank. 2.15 g (63%), Schmp. 110–112°. $[\alpha]_D^{20}$: -18.6° ($c = 0.5$ in DMF).

$C_{29}H_{37}N_7O_{10}S$ (675.7) Ber. C 51.55 H 5.52 N 14.41 S 4.75
Gef. C 51.54 H 5.65 N 14.71 S 4.87

tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyll- α -aza-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamid (**13**): Die Lösung von 675 mg (1 mMol) **12** und 360 mg *L-Prolyll-L-leucyl-glycinamid* in 3–4 ccm Dimethylformamid wird 3–4 Tage bei Raumtemp. belassen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben, in ca. 50 ccm n-Butanol gelöst, dreimal mit 5proz. Citronensäure in gesätt. Natriumchloridlösung sowie zweimal mit NaCl-gesätt. 5proz. KHCO₃-Lösung geschüttelt und mit einem Gemisch von KHCO₃ und MgSO₄ über Nacht getrocknet. Der Rückstand wird zweimal mit 2 ccm ca. 5proz. Essigsäure verrieben, abgesaugt und i. Vak. getrocknet. Ausb. 645 mg (80%). Gef. N 15.86%. **13** ist

elektrophoretisch einheitlich. Die Aminosäureanalyse nach Hydrolyse ergab Glu 0.98; Pro 1.01; Leu 1.00; Gly 1.14 (incl. Anteil aus der Zersetzung von Hydrazinoessigsäure).

Das Produkt bindet hartnäckig Nitrophenol. Um mögliche Nebenprodukte, die aus α -Aza-asparaginpeptiden besonders im schwach alkalischen Medium entstehen können, auszuschließen, wurde bis zur Erreichung des berechneten N-Wertes gereinigt durch Waschen mit ca. 2 ccm Wasser und kurzes Rühren der Lösung in Äthanol mit Al_2O_3 . Ausb. 450 mg (56%) amorphes Reinprodukt, Schmelzbereich $135\text{--}145^\circ$, sowie eine salz- und nitrophenolhaltige Fraktion. $[\alpha]_D^{20}$: -9.8° ($c = 0.5$ in DMF).

$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{S}$ (807.0) Ber. C 52.10 H 6.75 N 17.36 S 3.97
Gef. C 51.89 H 6.88 N 17.22 S 4.5

[487/68]