

132. *l*-Lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure

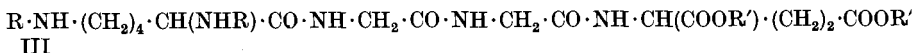
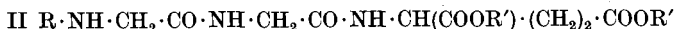
von V. Prelog und P. Wieland.

(22. VI. 46.)

Für Studien, über die wir in einem andern Zusammenhang später berichten wollen, benötigten wir Polypeptide mit einer bestimmten Verteilung der polaren Gruppen. Wir beschreiben in dieser Mitteilung die Synthese eines solchen Polypeptides, der *l*-Lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure, die wir nach den von *M. Bergmann* und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten Methoden durchgeführt haben. Sowohl das erwähnte Tetrapeptid als auch die meisten Zwischenprodukte waren bisher unbekannt.

Als Ausgangsprodukt diente der *l*-Glutaminsäure-diäthylester, welcher mit Carbobenzoxy-glycyl-chlorid<sup>1)</sup> den Carbobenzoxy-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (Ia)<sup>2)</sup> gab. Der nach Entfernung des Carbobenzoxy-Restes durch Hydrierung mit Palladium erhaltene Glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (Ib) wurde mit Carbobenzoxy-glycyl-chlorid in den Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (IIa) übergeführt, aus welchem wieder der Carbobenzoxy-Rest durch Hydrierung mit Palladium entfernt wurde.

Der Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (IIb) gab mit Dicarbenzoxy-*l*-lysyl-azid<sup>3)</sup> den Dicarbenzoxy-*l*-lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (IIIa), in welchem zuerst durch Hydrogenolyse die beiden Carbobenzoxy-Reste durch Wasserstoff ersetzt wurden, worauf sich durch Verseifung mit Barium-hydroxyd und Entfernung der Barium-Ionen das freie Tetrapeptid IIIc herstellen liess. Die Verbindung, welche sehr hygroskopisch ist, wurde auch als Di-*p*-brom-benzoyl-Derivat charakterisiert.

a) R = Carbobenzoxy; R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>b) R = H; R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

c) R = H; R' = H

Der *Rockefeller Foundation* in New York danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>1)</sup> *M. Bergmann* und *L. Zervas*, B. 65, 1195 (1932).

<sup>2)</sup> Die Glycyl-*l*-glutaminsäure wurde auf einem anderen Wege von *E. Fischer*, *W. Kropp* und *A. Stahlschmidt*, A. 365, 188 (1909) hergestellt.

<sup>3)</sup> *M. Bergmann*, *L. Zervas* und *J. P. Greenstein*, B. 65, 1694 (1932).

Experimenteller Teil<sup>1)</sup>.Glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (Ib).

Hydrochlorid. Die Herstellung des Carbobenzoxy-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylesters erfolgte durch langsames Eintropfen einer auf 0° abgekühlten Lösung von 4,7 g Carbobenzoxy-glycyl-chlorid<sup>2)</sup> in 30 cm<sup>3</sup> absolutem Äther in eine auf -10° gekühlte Lösung von 9 g *l*-Glutaminsäure-diäthylester in 40 cm<sup>3</sup> trockenem Essigester. Nach halbstündigem Rühren unter Kühlung mit einer Eis-Kochsalz-Mischung wurde noch 3/4 Stunden unter langsamem Erwärmen auf Zimmertemperatur gerührt. Aus der Reaktionslösung krystallisierten über Nacht bei -10° 4,2 g (ber. 4,95 g) *l*-Glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid vom Smp. 112—113°, welches bisher nicht genauer beschrieben wurde<sup>3)</sup>. Zur Analyse wurde die in farblosen Blättchen krystallisierende, sehr hygroskopische Verbindung aus Essigester umgelöst und bei 85° im Hochvakuum sublimiert.

3,798 mg Subst. gaben 6,272 mg CO<sub>2</sub> und 2,570 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>NCl Ber. C 45,09 H 7,57%

Gef. „ 45,07 „ 7,57%

$[\alpha]_D^{16} = +20,5^\circ (\pm 2^\circ)$  (c = 1,12 in Wasser)

Das mit verdünnter Salzsäure, Wasser, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschene Filtrat hinterliess nach Trocknen und Eindampfen im Vakuum 7,64 g eines farblosen Öles, welches über Nacht in 100 cm<sup>3</sup> Feinsprit unter Zusatz von 500 mg Palladium-Schwarz und 1,6 cm<sup>3</sup> 12-n. Salzsäure hydriert wurde. Die Aufarbeitung (Abfiltrieren vom Palladium und Eindampfen im Vakuum) führte zu 5,8 g eines farblosen Öles, welches in 30 cm<sup>3</sup> Essigester gelöst wurde. Nach einer Stunde Stehenlassen bei -10° wurden die ausgeschiedenen Krystalle abfiltriert, mit Essigester nachgewaschen und 44 Stunden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Ausbeute 5,46 g. Die Verbindung krystallisierte in farblosen Nadeln vom Smp. 116—117°.

$[\alpha]_D^{17} = -12^\circ (\pm 2^\circ)$  (c = 0,819 in Feinsprit).

Pikrolonat. 60 mg des Hydrochlorids wurden mit 0,1 cm<sup>3</sup> Wasser und 100 mg Kaliumcarbonat versetzt. Nach Ausschütteln mit Essigester, Trocknen und Eindampfen der Lösung der freien Base wurde eine Lösung von 50 mg Pikrolonsäure in Essigester zugegeben, worauf sich das Pikrolonat langsam in moosartigen Krystallen ausschied. Zur Analyse wurde dreimal aus Essigester umgelöst und 48 Stunden bei 40° und 0,01 mm getrocknet, Smp. 172—173°.

3,722 mg Subst. gaben 6,557 mg CO<sub>2</sub> und 1,797 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>N<sub>6</sub> Ber. C 48,09 H 5,38%

Gef. „ 48,07 „ 5,40%

Glycyl-*l*-glutaminsäure (Ic).

80 mg Glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester wurden während 3 Stunden mit 2 cm<sup>3</sup> 0,375-n. Bariumhydroxyd-Lösung geschüttelt. Nach Entfernung der Barium-Ionen mit der berechneten Menge Schwefelsäure konnte die freie Glycyl-*l*-glutaminsäure<sup>4)</sup> aus der eingengteten wässrigen Lösung mit Alkohol ausgefällt werden. Das erhaltene gelbliche Pulver wog nach 48-stündigem Trocknen im Hochvakuum bei 95° 40 mg und zeigte ein

$[\alpha]_D^{16} = -5^\circ (\pm 0,6^\circ)$  (c = 3,54 in Wasser)

p-Brom-benzoyl-Derivat. Die Herstellung der p-Brom-benzoyl-glycyl-*l*-glutaminsäure erfolgte durch 1/4-stündiges Schütteln einer Lösung von 100 mg Glycyl-*l*-

<sup>1)</sup> Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

<sup>2)</sup> *M. Bergmann* und *L. Zervas*, B. **65**, 1194 (1932).

<sup>3)</sup> Vgl. B. **44**, 1333 (1911); Z. physiol. Ch. **74**, 456 (1911).

<sup>4)</sup> Vgl. *E. Fischer*, *W. Kropp* und *A. Stahlschmidt*, A. **365**, 191 (1909);  $[\alpha]_D^{20} = -6,1^\circ (\pm 0,2^\circ)$ .

glutaminsäure in 1,8 cm<sup>3</sup> 1-n. Natronlauge unter Eiskühlung mit 120 mg p-Brom-benzoylchlorid. Nach weiterem 2-stündigem Schütteln bei Zimmertemperatur wurde mit Schwefelsäure versetzt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen und getrockneten Essigester-Lösungen hinterliessen einen krystallinen Rückstand, welcher zur Entfernung der gebildeten p-Brom-benzoesäure mit Äther behandelt wurde. Das Unlösliche bestand aus 90 mg eines farblosen Pulvers vom Smp. 178—179°. Zur Analyse wurde aus Methanol-Essigester umgelöst und 16 Stunden bei 75° und 0,01 mm getrocknet. Die Verbindung krystallisierte in Nadeln und schmolz bei 183—184°.

$$[\alpha]_D^{20} = +3^{\circ} (\pm 2^{\circ}) \quad (c = 0,97 \text{ in Feinsprit})$$

3,676 mg Subst. gaben 5,860 mg CO<sub>2</sub> und 1,274 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}_2\text{Br} \quad \text{Ber. C } 43,42 \quad \text{H } 3,91\% \\ \text{Gef. } \quad 43,50 \quad \quad 3,88\% \end{array}$$

#### Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (IIb).

Hydrochlorid. Aus 8 g Glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid wurde die Base mit 4 g Kaliumcarbonat in 3 cm<sup>3</sup> Wasser in Freiheit gesetzt und durch wiederholtes Ausschütteln mit Essigester bei 0° isoliert. Die vereinten Essigester-Lösungen hinterliessen nach Eindampfen im Vakuum 7,06 g eines gelblichen Öles, welches in 70 cm<sup>3</sup> trockenem Essigester tropfenweise unter Rühren und Kühlen mit einer Eis-Kochsalz-Mischung mit einer Lösung von 6,4 g Carbobenzoxyl-glycylchlorid in 45 cm<sup>3</sup> absolutem Äther versetzt wurde. Gleichzeitig gab man 8 g wasserfreies Kaliumcarbonat in 5 Portionen zu. Nach beendetem Eintropfen wurde noch eine Stunde unter Zusatz von weiteren 8 g Kaliumcarbonat in 5 Portionen bei 0° und anschliessend 2 Stunden unter langsamem Erwärmen auf Zimmertemperatur gerührt. Nach dem Verdampfen der mit Wasser, verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschenen und getrockneten Lösung des Reaktionsproduktes blieben 8,88 g eines gelben Öles zurück.

Dieses wurde in 100 cm<sup>3</sup> Feinsprit unter Zusatz von 1,64 cm<sup>3</sup> 12-n. Salzsäure und 600 mg Palladium-Schwarz über Nacht hydriert. Die übliche Aufarbeitung führte nach Umlösen aus Alkohol-Essigester zu 4,8 g Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid vom Smp. 174—174,5°. Aus den Mutterlaugen wurden noch 400 mg eines weniger reinen Produktes vom Smp. 160—161° erhalten. Die Verbindung krystallisierte aus Alkohol-Essigester in feinen Nadeln.

$$[\alpha]_D^{17} = -16,5^{\circ} (\pm 1,5^{\circ}) \quad (c = 1,28 \text{ in Feinsprit})$$

Das Pikrolonat, welches aus 28 mg der freien Base und 25 mg Pikrolonsäure hergestellt wurde, schmolz bei 158,5—159,5°. Zur Analyse wurde aus Alkohol-Essigester umgelöst und 40 Stunden bei 45° und 0,02 mm getrocknet.

3,750 mg Subst. gaben 6,496 mg CO<sub>2</sub> und 1,787 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{11}\text{N}_7 \quad \text{Ber. C } 47,50 \quad \text{H } 5,37\% \\ \text{Gef. } \quad 47,27 \quad \quad 5,33\% \end{array}$$

#### Dicarbobenzoxy-*l*-lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester (IIIa).

Die Herstellung von Dicarbobenzoxy-*l*-lysyl-azid<sup>1)</sup> erfolgte durch Auflösen von 5,45 g Dicarbobenzoxy-*l*-lysylhydrazid in 20 cm<sup>3</sup> Eisessig und Eingiessen in eine Lösung von 6 cm<sup>3</sup> konz. Salzsäure in 100 cm<sup>3</sup> Wasser, worauf die klare Lösung auf 0° abgekühlt, mit 100 cm<sup>3</sup> Äther überschichtet und bei —3° unter starkem Umschwenken mit einer Lösung von 1,2 g Natriumnitrit in 20 cm<sup>3</sup> Wasser tropfenweise innert 5 Minuten versetzt wurde. Unmittelbar darauf schieden sich in der ätherischen Schicht gallertige Flocken aus. Nach Waschen der ätherischen Lösungen mit Wasser, bis die wässerigen Auszüge nicht

<sup>1)</sup> M. Bergmann, L. Zervas und J. P. Greenstein, B. 65, 1694 (1932).

mehr kongosauer reagierten, wurde kurz mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und mit absolutem Äther nachgewaschen. Die filtrierte ätherische Lösung, welche das Dicarbobenzoxyl-lysyl-azid enthielt, wurde sofort für die weitere Umsetzung verwendet. Der Filtrerrückstand enthielt neben dem zugesetzten Natriumsulfat das als Nebenprodukt entstandene Dicarbobenzoxyl-lysyl-amid (vgl. weiter unten).

Aus 4,5 g Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid, 2 g Kaliumcarbonat und 6 cm<sup>3</sup> Wasser wurden durch mehrmaliges Ausschütteln mit Essigester bei 0° nach Trocknen und Eindampfen der Essigester-Lösungen 4,1 g des freien öligen Tripeptid-esters erhalten. In die auf 0° abgekühlte Lösung der Base in 600 cm<sup>3</sup> trockenem Essigester wurde die ätherische Dicarbobenzoxyl-lysyl-azid-Lösung (vgl. oben) unter starkem Rühren innert 20 Minuten eingetropt. Nach 2-stündigem Rühren bei 0° liessen wir die Reaktionslösung über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Der Rückstand, welcher nach Waschen mit verdünnter Salzsäure, Wasser, 5-proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, Trocknen und Eindampfen erhalten wurde, kristallisierte aus Alkohol-Essigester langsam in Form farbloser Flocken vom Smp. 131—132° aus. Ausbeute 3,9 g. Zur Analyse wurde aus Alkohol-Essigester bis zum konstanten Smp. 134—135° umgelöst und 16 Stunden bei 70° und 0,02 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{17} = -9,5^{\circ} (\pm 1,5^{\circ}) \quad (c = 1,47 \text{ in Feinsprit})$$

3,864 mg Subst. gaben 8,329 mg CO<sub>2</sub> und 2,320 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{O}_{11}\text{N}_5 \quad \text{Ber. C } 58,89 \quad \text{H } 6,64\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{, } 58,82 \quad \quad \text{, } 6,72\% \end{array}$$

Der durch Waschen mit Wasser vom Natriumsulfat befreite Filtrerrückstand, der bei der Herstellung des Dicarbobenzoxyl-lysyl-azids entstanden war, wog 2,88 g und schmolz bei 150—153°. Zur Analyse wurde bis zum konstanten Smp. von 155—155,5° aus Alkohol umgelöst und 14 Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet. Die Verbindung kristallisierte in verfilzten Nadeln. Mit einem nach *Bergmann* und Mitarbeitern hergestellten Dicarbobenzoxyl-lysyl-amid (Smp. 153—154°,  $[\alpha]_D^{16} = 0^{\circ} (\pm 2^{\circ})$  ( $c = 1,04$  in Pyridin)<sup>1)</sup> wurde keine Schmelzpunktserniedrigung beobachtet.

$$[\alpha]_D^{17} = 0^{\circ} (\pm 2^{\circ}) \quad (c = 0,721 \text{ in Pyridin})$$

3,692 mg Subst. gaben 8,678 mg CO<sub>2</sub> und 2,130 mg H<sub>2</sub>O

2,370 mg Subst. gaben 0,219 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (19°, 715 mm)

$$\begin{array}{l} \text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{N}_3 \quad \text{Ber. C } 63,90 \quad \text{H } 6,58 \quad \text{N } 10,16\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{, } 64,14 \quad \quad \text{, } 6,46 \quad \quad \text{, } 10,16\% \end{array}$$

Die Umsetzung von Dicarbobenzoxyl-lysyl-chlorid<sup>2)</sup> mit Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester in Essigester unter Zusatz von Kaliumcarbonat führte zu einem unreineren Produkt in geringerer Ausbeute. Aus 700 mg Dicarbobenzoxyl-lysin<sup>2)</sup> und 650 mg Glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid wurden 230 mg Dicarbobenzoxyl-lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester vom Smp. 123—124,5° erhalten.

#### *l*-Lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure (IIIc).

3,4 g Dicarbobenzoxyl-lysyl-glycyl-glycyl-*l*-glutaminsäure-diäthylester wurden unter Zusatz von 800 mg Palladium-Schwarz und 4,8 cm<sup>3</sup> 1,98-n. Schwefelsäure in 100 cm<sup>3</sup> Feinsprit über Nacht hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung (Abfiltrieren vom Katalysator, Nachwaschen mit Feinsprit und Eindampfen im Vakuum) erfolgte die Verseifung des erhaltenen Öles durch 4-stündiges Stehenlassen mit 52 cm<sup>3</sup> 0,375-n. Bariumhydroxyd-Lösung. Anschliessend wurde mit 5,05 cm<sup>3</sup> 1,98-n. Schwefelsäure versetzt, vom Bariumsulfat

<sup>1)</sup> *M. Bergmann, L. Zervas und W. F. Ross, J. Biol. Chem.* **111**, 260 (1935), geben Smp. 155° an.

<sup>2)</sup> *M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke und H. Schleich, Z. physiol. Ch.* **224**, 31 (1934); *M. Bergmann, L. Zervas und W. F. Ross, J. Biol. Chem.* **111**, 249 (1935).

abzentrifugiert, auf 25 cm<sup>3</sup> eingengt und erneut zentrifugiert. Darauf wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft, mit absolutem Alkohol überschichtet und nach 2 Tagen abfiltriert. Das erhaltene farblose, körnige Pulver wog nach 16-stündigem Trocknen im Hochvakuum bei 80° 1,8 g. Zur Analyse wurde eine kleine Menge des Tetrapeptides in wenig Wasser gelöst, mit Aktivkohle kurz erwärmt, filtriert und mit absolutem Alkohol versetzt. Die sehr hygroskopische Verbindung zeigte nach 120-stündigem Trocknen im Hochvakuum bei 50° und 2-stündigem Trocknen bei 80° den gleichen unscharfen Schmelzpunkt wie das Rohprodukt, welches sich beim Erhitzen langsam zersetzte, um bei 180° vollständig zu schmelzen.

$$[\alpha]_D^{20} = +33,5^{\circ} (\pm 2^{\circ}) \quad (c = 0,953 \text{ in Wasser})$$

3,840 mg Subst. gaben 6,538 mg CO<sub>2</sub> und 2,554 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>N<sub>5</sub>    Ber. C 46,26    H 6,99%

Gef. „ 46,47    „ 7,44%

#### Di-(p-brom-benzoyl)-l-lysyl-glycyl-glycyl-l-glutaminsäure.

Die Herstellung der Di-(p-brom-benzoyl)-l-lysyl-glycyl-glycyl-l-glutaminsäure erfolgte durch 2-stündiges Schütteln einer Lösung von 93 mg l-Lysyl-glycyl-glycyl-l-glutaminsäure in 1 cm<sup>3</sup> 1-n. Natronlauge mit 130 mg p-Brom-benzoylchlorid. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 113 mg einer Verbindung vom Smp. 194° erhalten, welche aus Feinsprit in Rosetten kristallisierte. Das analysenreine Präparat schmolz nach 6-stündigem Trocknen bei 75° im Hochvakuum bei 198–200°.

$$[\alpha]_D^{20} = -4,5^{\circ} (\pm 3^{\circ}) \quad (c = 0,657 \text{ in Pyridin})$$

3,802 mg Subst. gaben 6,406 mg CO<sub>2</sub> und 1,547 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>    Ber. C 46,11    H 4,40%

Gef. „ 45,98    „ 4,55%

#### Di-(p-brom-benzoyl)-l-lysyl-glycin.

Aus 99,7 mg l-Lysyl-glycin-sulfat<sup>1)</sup>, 160 mg p-Brom-benzoylchlorid und 2 cm<sup>3</sup> 1-n. Natronlauge wurden, wie bei der Herstellung der p-Brom-benzoyl-glycyl-l-glutaminsäure beschrieben, 80 mg Di-(p-brom-benzoyl)-l-lysyl-glycin erhalten. Die Verbindung schmolz nach viermaligem Umkrystallisieren aus Methanol-Essigester bei 186,5–187,5°. Zur Analyse wurde 18 Stunden bei 80° und 0,01 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ} (\pm 2^{\circ}) \quad (c = 1,02 \text{ in Feinsprit})$$

3,864 mg Subst. gaben 6,558 mg CO<sub>2</sub> und 1,437 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>    Ber. C 46,41    H 4,07%

Gef. „ 46,32    „ 4,16%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

<sup>1)</sup> M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke und H. Schleich, Z. physiol. Ch. **224**, 32 (1934).