

Über lineare und cyclische Peptide der p-Aminobenzoesäure

Von WOLFGANG LANGENBECK und DIETER WEISBROD¹⁾

Inhaltsübersicht

Lineare Peptide der p-Aminobenzoesäure lassen sich nach Schutz der Aminogruppe mit dem Carbobenzoxyrest nach der gemischten Anhydrid-, Carbodiimid- und aktivierten Estermethode herstellen. Zu ihrer Cyclisierung bedient man sich am besten der Phosphitmethode.

In einer früheren Mitteilung²⁾ haben wir über die Darstellung von p-Aminobenzoesäurepeptiden nach der gemischten Anhydrid- und der Carbodiimidmethode berichtet. Die Synthese verläuft glatt, wenn die Aminogruppe durch den Carbobenzoxyrest geschützt wird. Bei Verwendung des Phthalyl- oder Formylrestes als Aminoschutzgruppe sind nach Untersuchungen anderer Autoren nur Dipeptide zugänglich³⁾.

In Fortführung unserer Arbeiten haben wir eine Reihe weiterer Peptide der p-Aminobenzoesäure dargestellt. Außer mit den genannten Methoden erfolgte die Knüpfung der Peptidbindung auch noch über aktivierte Ester und nach der Phosphitmethode. Die Synthese des linearen Tetrapeptids N-Carbobenzoxy-glycyl-p-aminobenzoyl-glycyl-p-aminobenzoesäure gelang sowohl durch Kondensation der beiden Dipeptide über das gemischte Anhydrid mit Chlorameisenester als auch schrittweise nach drei verschiedenen Synthesemethoden. Beim schrittweisen Aufbau wurde aus N-Carbobenzoxyglycin und Natrium-p-aminobenzoat mit Hilfe von Chlorameisenester das Dipeptid hergestellt, dieses nach dem Carbodiimidverfahren mit Glycin-p-nitrophenylester umgesetzt und der entstandene aktivierte Tripeptidester mit Natrium-p-aminobenzoat zum Tetrapeptid kondensiert.

Die bei der Darstellung von Tripeptiden und Tripeptidestern aus p-Aminobenzoesäure und ϵ -Aminocaprinsäure erhaltenen Ergebnisse stimmen

¹⁾ Teil der Dissertation D. WEISBROD, Universität Halle, 1964.

²⁾ W. LANGENBECK u. D. WEISBROD, J. prakt. Chem. [4] **28**, 78 (1965).

³⁾ F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS, D. A. A. KIDD u. G. R. SMITH, J. chem. Soc. [London] **1954**, 1039.

mit den früher gewonnenen überein. So liefert das Carbodiimidverfahren bei der Darstellung von N-Carbobenzoxy- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-äthylester bessere Ausbeuten als die gemischte Anhydridmethode. Die alkalische Esterverseifung von N-carbobenzoxy-geschützten Tripeptid-methyl-, -äthyl- und -p-nitrophenylestern mit wäßriger und alkoholischer Alkalilauge gelang nicht ohne Angriff der Peptidbindung. Lediglich aus dem ungeschützten ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-äthylester ließ sich durch Kochen mit Barytwasser das freie Tripeptid gewinnen.

Die Herstellung cyclischer p-Aminobenzoesäurepeptide gelang nach der Phosphitmethode unter Anwendung des Verdünnungsprinzips. Zur Cyclisierung kamen ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoesäure (I) und 11-Aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäure (II); ein geeignetes Lösungsmittel war Diäthylphosphit, als Kondensationsmittel verwendeten wir Tetraäthylpyrophosphit. Zusatz von Imidazol⁴⁾ bewirkte keine Steigerung der Ausbeute. Die Cyclisierung wurde in vorgegebener, 0,004 molarer Konzentration bei 140 °C durchgeführt. Bei starker Herabsetzung der Konzentration durch Eintropfen der Peptidlösung während eines längeren Zeitraumes ging die Ausbeute erheblich zurück.

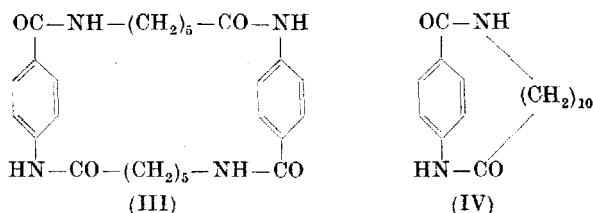
Sterisch interessant ist das Verhalten der beiden Linearpeptide I und II bei der Cyclisierung. Während aus dem Peptid II das cyclische Dipeptid Cyclo-11-aminoundecanoyl-p-aminobenzoyl (IV) entsteht, findet bei der Cyclisierung des linearen Dipeptids I wahrscheinlich Verdoppelung zu dem Tetrapeptid Cyclo- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl (III) statt. Diese Verdoppelungsreaktion findet ihre Erklärung in der Theorie von A. LÜTTRINGHAUS⁵⁾ zur para-Überbrückung des Benzolkerns. Danach ist zur spannungsfreien para-Überbrückung des Benzolkerns eine Kette von mindestens zehn Atomen erforderlich, während das Dipeptid I nur neun zur Verfügung stellen kann, also ein Ringglied zu wenig. Es findet daher zunächst Dimerisierung statt, daraufhin kann sich der Ring völlig spannungsfrei zum Cyclotetrapeptid schließen. Beim Linearpeptid II ist eine Verdoppelung nicht nötig, da die Kette mit vierzehn Gliedern über die erforderliche Anzahl verfügt. In diesem Fall tritt sogleich Cyclisierung zum Cyclodipeptid ein.

Das Molekulargewicht des Cyclodipeptids IV wurde kryoskopisch nach RAST in Hexahydro-p-aminobenzoesäurelactam bestimmt. Das Molekulargewicht des Cyclopeptids III ließ sich nicht exakt bestimmen, da es in den

⁴⁾ G. W. ANDERSON, A. C. MCGREGOR u. R. W. YOUNG, J. org. Chem. **23**, 1236 (1958); G. W. ANDERSON, Annal. N. Y. Acad. Sci. **88**, 676 (1960).

⁵⁾ A. LÜTTRINGHAUS, Naturwiss. **30**, 40 (1942).

meisten gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich ist. Die Bestimmung in Phenol ergab streuende Werte⁶⁾, deren arithmetisches Mittel jedoch ebenso wie die stereochemischen Überlegungen und die physikalischen Eigenschaften der Verbindung für das Cyclotetrapeptid sprechen.



Die zur Darstellung von Hexahydro-p-aminobenzoesäurelactam erforderliche Hydrierung von p-Aminobenzoesäure wurde nach einem neuen, einfachen Verfahren unter Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel durchgeführt. Danach lassen sich auch große Mengen p-Aminobenzoesäure bequem drucklos hydrieren.

Experimenteller Teil

Zur Darstellung von hier erwähnten, aber nicht beschriebenen Peptiden siehe unsere frühere Mitteilung²⁾.

Alle eingesetzten organischen Lösungsmittel müssen wasserfrei sein.

1. p-Aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-hydrobromid

3,8 g (1/100 Mol) N-Cbo-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure werden 30 Minuten bei 20°C mit 15 ml HBr/Eisessiglösung behandelt. Nach Fällen mit 300 ml Äther wird zweimal in je 30 ml Methanol gelöst und mit 800 ml Äther gefällt. Das meist als Öl anfallende Peptid-hydrobromid muß längere Zeit unter Äther im Eisschrank aufbewahrt werden, da es nur geringe Kristallisationsneigung besitzt.

F. 160°; Ausbeute: 1,9 g = 57,4% d. Th.

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_3$ (331,23) ber.: C 47,1; H 5,74; Br 24,2; N 8,46;
gef.: C 46,6; H 5,98; Br 24,7; N 8,19.

2. N-Cbo- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-äthylester

a) Mit Chlorameisenester

3,8 g (1/100 Mol) N-Cbo- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoesäure und 0,81 ml Pyridin werden in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst, bei -10°C in 10 Minuten 1,35 ml Chlorameisensäureisobutylester, gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran, zugetropft und noch 50 Minuten in der Kälte gerührt. Die Kupplung erfolgt durch Zugabe von 2,0 g ϵ -Aminocapronsäureäthylester-hydrochlorid (F. 98–103°), gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran und 0,81 ml Pyridin. Entfernen der Kühlung und 4 Stunden Rühren bei 20°C. Zur Aufarbeitung wird vom Pyridinhydrochlorid abfiltriert und der nach dem Einengen im Vakuum verbleibende

⁶⁾ I. ROTHE u. M. ROTHE, Chem. Ber. 88, 284 (1955).

Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Essigesterlösung wird mit 2 n HCl, Bicarbonatlösung und Wasser gewaschen und der nach Eindampfen im Vakuum erhaltene Rückstand zweimal aus Methanol/Wasser (3:2) umkristallisiert.

F. 134°; Ausbeute: 1,5 g = 28,8%.

$C_{26}H_{39}N_3O_6$ (525,66) ber.: C 66,27; H 7,43; N 8,00;
gef.: C 66,95; H 7,08; N 8,47.

b) Mit Carbodiimid

3,8 g (1/100 Mol) N-Cbo- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoesäure werden unter leichtem Erwärmen in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst, 2,0 g ϵ -Aminocapronsäure-äthylester-hydrochlorid und 0,81 ml Pyridin zugeben und mit 2,1 g Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nach 24 Stunden Stehen bei 20°C wird vom abgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff (Ausbeute: 4,25 g = 100% d. Th.) abfiltriert und wie unter a) aufgearbeitet.

F. 134°; Ausbeute: 3,5 g = 66,7%.

Gef.: C 66,15; H 7,46; N 8,06.

3. ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-äthylesterhydrobromid

5,3 g (1/100 Mol) der unter 2. erhaltenen Cbo-Verbindung werden 30 Minuten bei 20°C mit 10 ml HBr/Eisessiglösung behandelt, wobei unter CO₂-Entwicklung alles in Lösung geht. Durch Fällen mit 300 ml Äther und zweimaliges Umfällen mit 50 ml Methanol/800 ml Äther erhält man das Esterhydrobromid rein. Die Substanz fällt beim Versetzen mit Äther leicht als Öl aus, das aber nach längerem Stehen im Eisschrank durchkristallisiert.

F. 177–179°; Ausbeute: 3,8 g = 80,5%.

$C_{21}H_{34}BrN_3O_4$ (472,44) ber.: C 53,4; H 7,20; Br 16,95; N 8,90;
gef.: C 52,5; H 6,99; Br 16,90; N 9,09.

4. ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure

2,4 g (1/200 Mol) ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocapronsäure-äthylesterhydrobromid werden 2 Stunden mit 75 ml Barytwasser am Rückfluß gekocht, wobei sich die Substanz löst. Durch Einleiten von CO₂ wird das Barium als Carbonat ausgefällt, das Filtrat im Vakuum auf wenige ml eingengt und der Niederschlag aus wenig Methanol umkristallisiert.

F. 233° (Zers.); Ausbeute: 131 mg = 7,2%.

$C_{19}H_{26}N_3O_4$ (362,46) ber.: C 62,9; H 7,74; N 11,60;
gef.: C 62,1; H 7,82; N 11,25.

5. 11-Aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäurehydrobromid

9 g (1/50 Mol) N-Cbo-11-aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäure versetzt man mit 35 ml HBr/Eisessiglösung und erwärmt 45 Minuten im Wasserbad auf 40°C. Das Peptidhydrobromid wird auf die übliche Weise durch Umfällen mit Methanol/Äther gereinigt.

F. 236–238° (Zers.); Ausbeute: 7,5 g = 94%.

$C_{18}H_{29}BrN_2O_3$ (401,36) ber.: C 53,81; H 7,23; Br 19,99; N 6,98;
gef.: C 53,38; H 7,30; Br 19,8; N 7,06.

6. 11-Aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäure

Von 9 g (1/50 Mol) N-Cbo-11-aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäure spaltet man wie unter 5. den Cbo-Rest ab, isoliert das Peptid-hydrobromid jedoch nicht, sondern löst in 100 ml Methanol, neutralisiert mit 1,6 ml Pyridin und fällt das freie Dipeptid mit 250 ml Wasser aus. Aus Dimethylformamid/Wasser wird umkristallisiert.

F. 204–207°; Ausbeute: 4 g = 64,6%.

$C_{18}H_{28}N_2O_3$ (320,44) ber.: C 67,5; H 8,75; N 8,75;
gef.: C 67,35; H 8,55; N 8,39.

7. N-Cbo-glycyl-p-aminobenzoyl-glycyl-p-aminobenzoesäure

a) Schrittweiser Aufbau

Nach LANGENBECK und WEISBROD²⁾ wird N-Cbo-glycyl-p-aminobenzoyl-glycin-p-nitrophenylester hergestellt.

4,1 g des aktiven Esters löst man in 30 ml Tetrahydrofuran/20 ml Dimethylformamid, gibt eine Lösung von 1,2 g p-Aminobenzoesäure und 0,35 g Ätznatron in 10 ml Wasser zu und kocht 4 Stunden am Rückfluß. Das nach Einengen im Vakuum zurückbleibende zähe Öl wird mit 50 ml Methanol verdünnt und in 1/2 l Wasser eingegossen. Das erhaltene kristalline Produkt wird mehrmals mit 200 ml Methanol ausgekocht und aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert.

F. 297° (Zers.); Ausbeute: 0,3 g = 7,4%.

$C_{26}H_{24}N_4O_7$ (504,51) ber.: C 61,95; H 4,76; N 11,11;
gef.: C 60,70; H 4,94; N 10,78.

b) Kondensation von 2 Dipeptiden

3,3 g (1/100 Mol) N-Cbo-glycyl-p-aminobenzoesäure und 1,4 ml Triäthylamin werden in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst und bei -10°C mit 1,31 ml Chlorameisensäureisobutylester wie üblich zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Zum Reaktionsgemisch gibt man 2,75 g (1/100 Mol) Glycyl-p-aminobenzoesäure-hydrobromid in 20 ml (2/100 Mol) 1 n NaOH, rührt 3 Stunden bei 20° und 1 Stunde bei 40°C . Das Tetrapeptid fällt bereits während der Reaktion als dicker weißer Niederschlag aus. Nach Abziehen des Tetrahydrofurans im Vakuum wird das Produkt mehrmals mit 200 ml Methanol ausgekocht und aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert.

F. 297° (Zers.); Ausbeute: 2,0 g = 40%.

Gef.: C 62,39; H 4,99; N 11,26.

8. Cyclo- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl- ϵ -aminocaproyl-p-aminobenzoyl (III)

a) Cyclisierung in 0,004 molarer Konzentration ohne Imidazolzusatz

1,324 g (4/1000 Mol) ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoesäure-hydrobromid werden in der Kälte in 1 l Diäthylphosphit gelöst, 0,4 ml Pyridin zugegeben und mit 4,85 ml (5 Äq.) Tetraäthylpyrophosphit versetzt. Unter Stickstoffatmosphäre rührt man die Reaktionsmischung 4 Stunden bei 140°C . Aufarbeitung: Das Diäthylphosphit wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand zur Hydrolyse restlichen Lösungs- und Kondensationsmittels mit 100 ml Wasser versetzt, 1 l Methanol zugefügt und 1 Stunde gekocht. Es bleibt ein weißer, unlöslicher Rückstand von höhermolekularen, linearen Oligopeptiden (Ausbeute 168 mg). Beim Versetzen mit 0,9 l Wasser fällt eine geringe Menge Linearoligomerer aus,

von denen man abfiltriert. Die methanolisch-wäßrige Lösung wird nun durch Filtration durch Ionenaustauschersäulen von den restlichen, niedrigmolekularen Linearpeptiden befreit. Beim Einengen des Filtrats im Vakuum auf etwa 50 ml wird das Cyclotetrapeptid III als farblose, ninhydrinnegative, analysenreine Substanz gewonnen.

F. $\sim 380^\circ$ (Zers.); Ausbeute: 210 mg = 22,6% d. Th.

$C_{26}H_{32}N_4O_4$ (464,57) ber.: C 67,2; H 6,89; N 12,08;
gef.: C 66,8; H 7,04; N 12,19.

Versuche zur kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung in Phenol (F. = $43,0^\circ$; K = 7,2).

Einwaage [mg]		F [$^\circ$ C]	Δt	Molekulargewicht
Phenol	Peptid III			
164,2	11,9	41,8	1,2	434
		41,7	1,3	402
		41,9	1,1	474
140,5	11,0	41,5	1,5	376
		41,6	1,4	403
		41,8	1,2	469
		41,9	1,1	512
152,0	13,1	41,7	1,3	423
		41,9	1,1	500
		41,9	1,1	500

Arithmetisches Mittel 449

Vorbehandlung der verwendeten Ionenaustauscher: Geeignet sind der Kationenaustauscher Wofatit KPS 200 und der Anionenaustauscher Wofatit L 150, die in dieser Reihenfolge hintereinandergeschaltet werden. Nach Überführung in die H⁺- und OH⁻-Form müssen die Austauscher mit Lösungen von 10, 20, 30, 40 und 50% Methanol in Wasser gespült werden, um sie für methanolisch-wäßrige Lösungen gebrauchsfertig zu machen.

b) Cyclisierung in 0,004 molarer Konzentration mit Imidazolzusatz

Zu dem unter a) angegebenen Reaktionsansatz werden noch 1,4 g Imidazol (äquivalent Tetraäthylpyrophosphit) gegeben. Cyclisierung und Aufarbeitung werden wie beschrieben durchgeführt. Anteil an methanolunlöslichen Linearoligomeren: 168 mg.

Ausbeute an Cyclotetrapeptid: 215 mg = 23,2%.

Gef.: C 66,7; H 6,99; N 11,90.

c) Cyclisierung nach dem Zutropfverfahren (ohne Imidazol)

In ein auf 140° C erhitztes Gemisch von 1 l Diäthylphosphit, 4,85 ml Tetraäthylpyrophosphit und 0,4 ml Pyridin läßt man unter Stickstoffatmosphäre und starkem Rühren eine Lösung von 1,324 g (4/1000 Mol) ϵ -Aminocaproyl-p-aminobenzoesäure-hydrobromid in 50 ml Dimethylformamid im Verlauf von 6 Stunden eintropfen und rührt noch weitere 2 Stunden bei 140° C. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter a). Methanolunlösliche Oligomere werden nicht erhalten.

Ausbeute an Cyclotetrapeptid: 53 mg = 5,7%.

9. Cyclo-11-aminoundecanoyl-p-aminobenzoyl (IV)

a) Cyclisierung in 0,004 molarer Konzentration ohne Imidazolzusatz

1,604 g (4/1000 Mol) 11-Aminoundecanoyl-p-aminobenzoesäure-hydrobromid werden in der Kälte in 1 l Diäthylphosphit gelöst, 0,4 ml Pyridin zugegeben und mit 4,85 ml (5 Äq.) Tetraäthylpyrophosphit versetzt. Unter Stickstoffatmosphäre rührt man die Reaktionsmischung 4 Stunden bei 140°C. Aufarbeitung: Nach Destillation des Diäthylphosphits im Vakuum hinterbleibt ein schwach gelbes Öl, das sich in 0,1 l Wasser/1 l Methanol löst. Beim Versetzen mit 0,9 l Wasser fallen 220–280 mg höhermolekulare Linearoligomere als weißer Niederschlag aus. Die filtrierte Lösung wird wie unter 8 a) durch Ionenaustauscher filtriert und im Vakuum auf etwa 50 ml eingeeengt. Man erhält das in Methanol leicht-, in Wasser schwerlösliche Cyclodipeptid IV als farblose, ninhydrinnegative, analysenreine Substanz.

F. 218–220°; Ausbeute: 285 mg = 23,6%.

$C_{18}H_{26}N_2O_2$ (302,42) ber.: C 71,5; H 8,61; N 9,27;
gef.: C 71,1; H 8,81; N 9,03.

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung in Hexahydro-p-aminobenzoesäurelactam (F. = 196°; K = 40).

Einwaage [mg]		F [°C]	Δt	Molekulargewicht
Lactam	Peptid IV			
119,6	12,0	183,5	12,5	322
		183,0	13,0	309
		183,3	12,7	314
134,8	11,7	185,1	10,9	319
		185,6	10,4	334
		185,5	10,5	331
126,0	13,8	182,3	13,7	320
		182,0	14,0	313
		181,9	14,1	314

Arithmetisches Mittel 319,2

b) Cyclisierung in 0,004 molarer Konzentration mit Imidazolzusatz

Zu dem unter a) angegebenen Reaktionsansatz gibt man noch 1,4 g Imidazol (äquivalent Tetraäthylpyrophosphit), cyclisiert und arbeitet wie beschrieben auf. Methanol/wasser-unlösliche Linearoligomere: 250–320 mg.

F. 217–220°; Ausbeute: 262 mg = 21,7%.

Gef.: C 70,9; H 9,01; N 8,98.

10. Hydrierung von p-Aminobenzoesäure

68,5 g (1/2 Mol) p-Aminobenzoesäure werden in 600 ml Eisessig gelöst, 3–4 g PtO_2 zugesetzt und auf der Schüttelmaschine bei 20°C drucklos hydriert. Wenn etwa 1/3 der benötigten Wasserstoffmenge aufgenommen ist, läßt der Verbrauch an Wasserstoff nach, er erhöht sich aber wieder bei Zugabe von 0,5 g frischem Kontakt. Diese Prozedur muß einige

Male wiederholt werden, da das Platinoxid nach gewisser Zeit inaktiv wird. Sind 80% der theoretischen Menge Wasserstoff aufgenommen, so bricht man die Hydrierung zweckmäßig ab. Man filtriert vom Platin ab und destilliert den Eisessig im Vakuum. Die zurückbleibende zähe Masse wird in 100 ml Wasser gelöst, nach Abkühlen vom Ungelösten abfiltriert und nach der Vorschrift von G. WENDT⁷⁾ aufgearbeitet.

F. 302—304°; Ausbeute: 15 g cis-Hexahydro-p-aminobenzoesäure.

⁷⁾ G. WENDT, Chem. Ber. **75**, 427 (1942).

Halle, Institut für organische Chemie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg.

Bei der Redaktion eingegangen am 4. Dezember 1964.