

SYNTHESE DES IMMUNSPECIFISCHEN, POLYPEPTID-ARTIGEN HAPTENS DER ANTHRAX-SUBTILIS BACILLEN-GRUPPE. EIN SYNTHETISCHER BEWEIS DER KONSTITUTION DER NATÜRLICHEN POLYGLUTAMINSÄUREN*

V. BRUCKNER, M. KAJTÁR, J. KOVÁCS, H. NAGY und J. WEIN
Organisch-Chemisches Institut, Eötvös-Universität, Budapest

(Received 22 July 1957)

Zusammenfassung—Es wurde die Synthese der γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa), γ -Poly-D-glutaminsäure (IIIb) und der *mesoiden* γ -Poly-glutaminsäure (IIIc) durchgeführt.

Als Schlüsselsubstanz der Synthese diente der γ -Glutamyl-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (I) der L-L-Form (Ia), D-D-Form (Ib) bzw. L-D-Form (Ic); diese drei Startdipeptide wurden aus L- bzw. D-Glutaminsäure in mehreren Schritten aufgebaut. Die intermolekulare Polyacylierung der bifunktionellen Startdipeptide, die zur Bildung des γ -Poly-glutaminsäure- α -methylesters (II) der entsprechenden Konfiguration führte, liess sich auf viererlei Weise—durch Aktivierung der Carboxyl- bzw. Aminogruppe—bewirken. Nach der alkalischen Verseifung der Polyester (II) wurden die entsprechenden γ -Poly-glutaminsäuren über ihre schwerlöslichen Kupfer(II)-salze abgetrennt und durch Dialyse gereinigt.

Der chemische und der von Prof. G. Ivánovics durchgeführte serologische Vergleich der γ -Poly-glutaminsäuren verschiedener Konfiguration mit dem Anthrax-Polypeptid und dem Subtilis-Polypeptid brachte—in Übereinstimmung mit der früher mittels Abbau durchgeführten Konstitutionsermittlung—den Beweis, dass das Anthrax-Polypeptid die Konstitution der γ -Poly-D-glutaminsäure innehat. Da ausser der γ -Poly-D-glutaminsäure auch die *mesoide* γ -Polyglutaminsäure mit Antianthrax-Immunsereen eine Präzipitationsreaktion zeigte, ist es nicht ausgeschlossen, dass in den Peptidketten des Subtilis-Polypeptids D- und L- γ -Glutamylreste vergesellschaftet vorkommen.

Durch die Synthese der γ -Poly-D-glutaminsäure (=Anthrax-Polypeptid) wurde zum ersten Mal die Vollsynthese eines natürlichen Haptens verwirklicht.

Abstract— γ -Poly-L-glutamic acid (IIIa), γ -poly-D-glutamic acid (IIIb) and *mesoid* γ -poly-glutamic acid (IIIc) have been synthesised.

The syntheses started from $\alpha\alpha'$ -dimethyl γ -glutamyl-glutamate of either the L-L-form (Ia) or the D-D-form or the L-D-form, respectively, prepared from the corresponding glutamic acid stereoisomer in a series of consecutive steps. The directed intermolecular polyacylation of these bifunctional dipeptides to α -methyl γ -polyglutamates (II) of the respective configuration has been effected by activation either of the carboxyl or of the amino group, in altogether four different ways. The polyester so forming has then been hydrolysed with aqueous alkali, and the polyacid—isolated in form of its copper (II) salt—was purified after foregoing demetalation by carefully conducted dialysis.

The synthetic stereoisomers of γ -poly-glutamic acid have then been compared with the anthrax polypeptide and subtilis polypeptide. The γ -poly-D-glutamic acid proved to be identical in any respect with the anthrax polypeptide, and was found (by Prof. G. Ivánovics) to give a precipitation reaction with antianthrax horse immune serum. Since the *mesoid* γ -poly-glutamic acid was likewise found to produce a precipitate in this reaction it appears that the subtilis polypeptide may contain peptide chains composed of units of both the L- and the D-form of glutamic acid.

The synthesis of γ -poly-D-glutamic acid (=anthrax polypeptide) represents the first total synthesis of a natural hapten.

* Vorläufige Mitteilungen: *Naturwissenschaften* **42**, 210 (1955); **42**, 463 (1955); **44**, 89 (1957).

ZUR PROBLEMSTELLUNG

VOR geraumer Zeit haben Ivánovics und Bruckner¹ über die Isolierung der immun-spezifischen Substanz der Milzbrandbacillenkapsel berichtet und gezeigt, dass diese Substanz ein biuret negatives Polypeptid darstellt, das bei der salzsauren Hydrolyse in hoher Ausbeute D(-)-Glutaminsäure-hydrochlorid liefert. Gleichzeitig wurde auch gefunden, dass verschiedene grampositive, aërobe, mesophile Sporenträger (z. B. *B. subtilis*, früher als *B. mesentericus* bezeichnet) eine Substanz in ihren Nährboden ausscheiden, die sich besonders leicht isolieren lässt; sie schien mit der spezifischen Kapselsubstanz der Milzbrandbacillen (*B. anthracis*) identisch zu sein. Es sollen im folgenden diese zwei Polypeptide als Anthrax-Polypeptid (APP) bzw. als Subtilis-Polypeptid (SPP) bezeichnet werden.

Spätere Untersuchungen^{2,3} haben den strengen Beweis erbracht, dass beide Polypeptide nur aus Glutaminsäureresten aufgebaut sind, d.h. monotone Polypeptide darstellen, wie dies unmittelbar nach ihrer ersten Untersuchung^{1,4} bereits vermutet wurde. Man hat auch bewiesen, dass das APP eine D-konfigurative Einheitlichkeit besitzt^{3,5} (sie ist also eine optisch reine Poly-D-glutaminsäure), hingegen scheint das SPP, das aus dem Nährboden der auf die ursprüngliche Art¹ gezüchteten *B. subtilis* Stämme abgetrennt werden kann, etwa 85% D-isomere und 15% L-isomere Glutaminsäurereste zu enthalten.⁵ Unlängst wurde sogar gefunden,⁶ dass das Mengenverhältnis der D- und L-isomeren Bausteine beim SPP sehr stark von der Züchtungsart ein und desselben *B. subtilis* Stammes abhängt, so dass die Menge der eingebauten L-Glutaminsäurereste fallweise auch 80% betragen kann. Nun wurden SPP Präparate, deren Gehalt an L-Glutaminsäureresten 15–20% stark überwiegt, bisher serologisch nicht geprüft. Hingegen ist festgestellt worden, dass das nach dem ursprünglichen Verfahren¹ gewinnbare SPP eine ebenso ausgeprägte serologische Reaktion aufweist wie das APP: Die Lösungen beider Polypeptide zeigen mit Antianthrax-Immunsereen bis zu einer Verdünnung von $3,2 \times 10^6$ eine Präzipitationsreaktion.¹ Nach den immunbiologischen Untersuchungen ist das APP und ebenso auch das (nach dem ursprünglichen Verfahren¹ gewinnbare) SPP als immunspezifisches Hapten (Halbantigen) der Anthrax-Subtilis Bacillengruppe zu betrachten.

Aus den Ergebnissen eines speziellen Abbaus, dem das APP und das SPP unterworfen wurde, konnte man darauf schliessen, dass beide Polypeptide γ -Poly-glutaminsäuren (III) darstellen.⁷ Die Zuverlässigkeit dieser Aussage wurde vorerst durch den analogen Abbau des synthetisch gewonnenen α -Poly-L-glutaminsäure- γ -methylesters und seines D-Antipoden auf indirekte Weise bewiesen: Es liess sich das für die α -Glutamylbindung charakteristische Abbauprodukt, die $\alpha\gamma$ -Diaminobuttersäure (in Form ihres Diflavianats) fassen, während das für die γ -Glutamylbindung charak-

¹ G. Ivánovics und V. Bruckner *Naturwissenschaften* **25**, 250 (1937); *Z. Immunforsch.* **90**, 304 (1937); **91**, 175 (1937).

² M. Bovarnick *J. Biol. Chem.* **145**, 415 (1942); G. Pongor *Experientia* **6**, 421 (1950).

³ W. E. Hanby und H. N. Rydon *Biochem. J.* **40**, 297 (1946).

⁴ V. Bruckner, G. Ivánovics und M. Kovács Oskolás *Magy. Chem. Foly.* **45**, 131 (1939); V. Bruckner und M. Kovács Oskolás *Acta Chem. et Phys. Univ. Szeged* **1**, 144 (1943).

⁵ D. W. Watson, W. J. Cromartie, W. L. Bloom, R. J. Heckly, W. J. McGhee und N. Weissman *J. Infect. Dis.* **80**, 121 (1947); M. Torii *Med. J. Osaka Univ.* **6**, 725 (1955); **6**, 1043 (1956).

⁶ C. B. Thorne, C. G. Gómez, H. E. Noyes und R. D. Housewright *J. Bact.* **68**, 307 (1954).

⁷ J. Kovács und V. Bruckner *Research* **5**, 194 (1952); *J. Chem. Soc.* 4255 (1952); V. Bruckner, J. Kovács und H. Nagy *J. Chem. Soc.* 148 (1953); V. Bruckner, J. Kovács, K. Kovács und H. Nagy *Experientia* **9**, 63 (1953); V. Bruckner, J. Kovács und G. Dénes *Nature, Lond.* **172**, 508 (1953); V. Bruckner, J. Kovács und I. Kandel *Naturwissenschaften* **40**, 243 (1953); V. Bruckner, J. Kovács, I. Kandel und G. Dénes *Hung. Acta Chim.* **7**, 223 (1955).

teristische Abbauprodukt, die β -Formylpropionsäure weder präparativ (z.B. als *p*-Nitrophenylhydrazon), noch chromatographisch nachgewiesen werden konnte.^{8,9} Unlängst konnte auch ein direkter Beweis für die Brauchbarkeit des konstitutionsermittelnden Abbaus geliefert werden, und zwar an Hand des synthetisch zugänglichen¹⁰ α,γ -Poly-L-glutaminsäure-methylesters, der dadurch gekennzeichnet ist, dass sich in seiner Peptidkette α - und γ -Glutamylbindungen laufend abwechseln. Hier konnten in der Tat beide erwarteten Abbauprodukte präparativ gefasst werden.

Für die Konstitutionsermittlung des APP's und des SPP's war es ausschlaggebend, dass sich die synthetischen α -Poly-glutaminsäuren nicht nur durch das Ergebnis ihres speziellen Abbaus, sondern auch in ihren Eigenschaften (d.h. sehr schlechte Löslichkeit in Wasser, positive Biuretreaktion, Racemisierung in alkalischer Lösung, keine serologische Reaktion) vom APP bzw. SPP sehr charakteristisch unterschieden. Es war somit die Aussage von Hanby und Mitarbeitern,^{3, 11} dass nämlich das APP vorwiegend (dasjenige ursprünglicher Isolierungsart¹ sogar ausschliesslich nur) α -Glutamylbindungen enthielte, widerlegt worden.

Als letzten Schritt des Konstitutionsbeweises haben wir jetzt die Synthese des APP's, d.h. der γ -Poly-D-glutaminsäure (IIIb) durchgeführt, nachdem der am besten geeignete Weg vorerst in der L-Reihe aufgesucht wurde.^{12, 13} Gleichzeitig mit den letztgenannten Vorarbeiten und unabhängig von uns hat auch Waley¹⁴ die Synthese der γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa) verwirklicht. Als Schlüsselsubstanz der Synthese bediente sich Waley desselben Dipeptidderivats wie wir (s. unten: L-L-Startdipeptid; Ia); auch wurden beim Aufbau des letzteren prinzipiell die gleichen Wege eingeschlagen. Ausser der γ -Poly-glutaminsäure der D- und der L-Reihe haben wir auch die Synthese der γ -Poly-(γ -L-glutamyl-D-glutaminsäure) (IIIc) verwirklicht. Dieser Typ der stereoisomeren γ -Poly-glutaminsäuren, der schlechthin als *mesoide* γ -Poly-glutaminsäure (IIIc) bezeichnet werden kann, ist dadurch gekennzeichnet, dass sich in seiner Peptidkette L- und D- γ -Glutamylreste laufend abwechseln. Dieses Produkt war besonders zum Vergleich mit dem SPP bestimmt.

ALLGEMEINER WEG DER SYNTHESEN

Die Synthese der oben aufgezählten drei stereoisomeren γ -Poly-glutaminsäuren gestaltete sich folgendermassen. Zuerst wurde der γ -Glutamyl-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (I) der entsprechenden sterischen Reihe aufgebaut; diese drei stereoisomeren Dipeptidderivate werden in folgendem als L-L-Startdipeptid (Ia), D-D-Startdipeptid (Ib) bzw. L-D-Startdipeptid (Ic) bezeichnet. Nun wurden die bifunktionellen Startdipeptide durch vorherige Aktivierung ihrer Carboxylgruppe bzw. Aminogruppe einer zur Bildung des γ -Poly-glutaminsäure- α -methylesters (II) führenden intermolekularen Polyacylierung unterworfen. Diese Umsetzung wurde in möglichst konzentriertester Lösung bewirkt, um die Wahrscheinlichkeit der Bildung von *cyclo*Peptiden

⁸ J. Kovács, V. Bruckner und K. Kovács *J. Chem. Soc.* 145 (1953); V. Bruckner, J. Kovács und K. Kovács *J. Chem. Soc.* 1512 (1953).

⁹ V. Bruckner, K. Kovács und J. Kovács *Hung. Acta Chim.* 3, 361 (1953); V. Bruckner, K. Kovács, J. Kovács und A. Kótai *Experientia* 10, 166 (1954); *Hung. Acta Chim.* 5, 267 (1955).

¹⁰ V. Bruckner, M. Szekerke und J. Kovács *Naturwissenschaften* 43, 107 (1956); *Z. Physiol. Chem.* 309, 25 (1957).

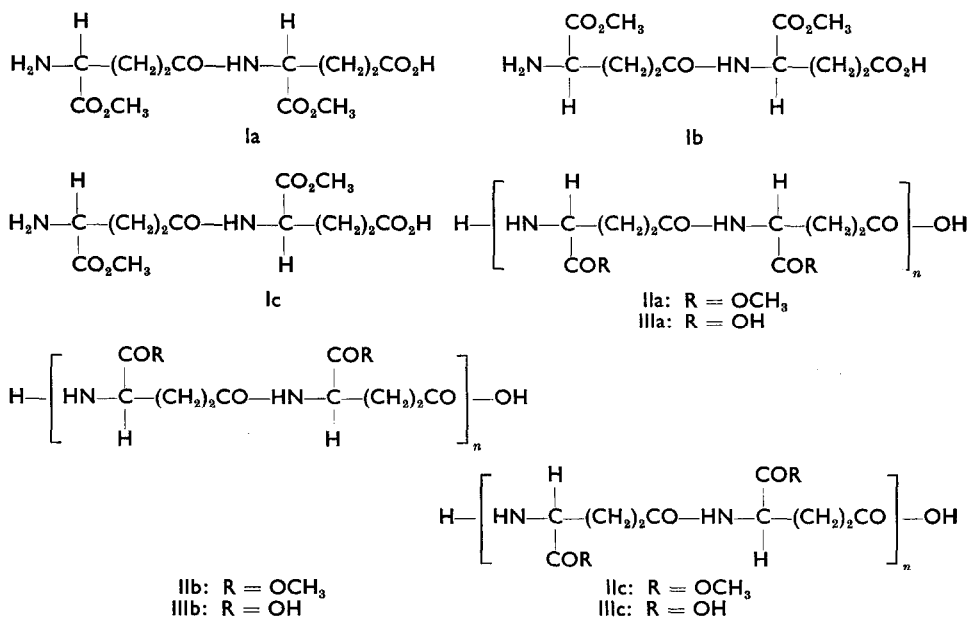
¹¹ W. E. Hanby, S. G. Waley und J. Watson *J. Chem. Soc.* 3239 (1950); H. N. Rydon *Biochemical Society Symposium* No. 1, p. 42. Cambridge (1948); E. J. Ambrose *J. Chem. Soc.* 3246 (1950).

¹² V. Bruckner, J. Kovács, H. Nagy und M. Kajtár *Hung. Acta Chim.* 6, 219 (1955); vorläufige Mitt. *Naturwissenschaften* 41, 528 (1954).

¹³ V. Bruckner, J. Wein, H. Nagy, M. Kajtár und J. Kovács *Naturwissenschaften* 42 210 (1955).

¹⁴ S. G. Waley *J. Chem. Soc.* 520 (1955); *Chem. & Ind. (Rev.)* 1148 (1954).

zu vermindern. Formal betrachtet dürfte angenommen werden, dass im Polyester die endständige Carboxyl- bzw. Aminogruppe noch in ihrer aktivierten Form vorliegt (vgl. z.B. die Formeln XVI, XXI und XXX), doch werden im Laufe der Herstellung der freien Polysäuren aus den entsprechenden Polyestern derartige Gruppen wieder zu freien Carboxyl- bzw. Aminogruppen umgewandelt. Zur Herstellung der freien Polysäure (III) wurde nämlich der Polyester alkalisch verseift, dann die Polysäure zuerst in Form ihres schwerlöslichen Kupfer(II)salzes abgeschieden, aus diesem mit Schwefelwasserstoff freigesetzt, durch Dialyse gereinigt bzw. von den niedrigeren Oligopeptiden befreit und zum Schluss aus der Lösung durch Gefrierdrying gewonnen. Es ist zu bemerken, dass Polyester, die in Dimethylformamid-Lösung hergestellt worden sind und die dieses Lösungsmittel stark binden, in Wasser löslich sind; dies ermöglichte die Einschaltung einer Dialyse gegen Wasser auch schon beim Polyester.



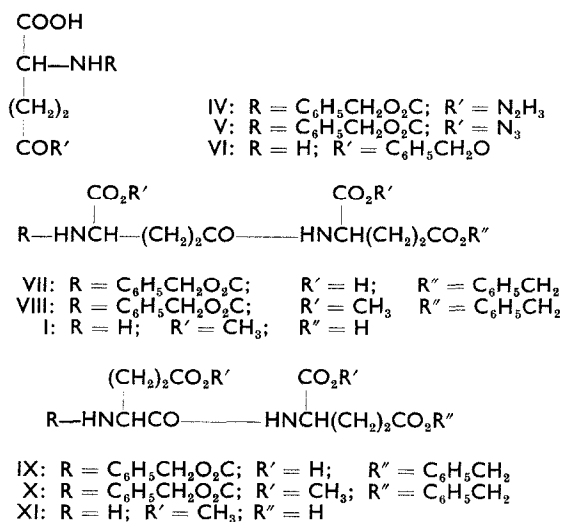
SYNTHESE DER STEREOISOMEREN STARTDIPEPTIDE

Über die Synthese des L-L-Startdipeptids, d.h. des γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters (Ia) haben wir¹² und unabhängig von uns auch Waley¹⁴ bereits ausführlich berichtet. Einige unterschiedliche Beobachtungen werden an Hand der analogen Synthese des D-D-Startdipeptids (Ib) angegeben.

Die Synthese des D-D-Startdipeptids, d.h. des γ -D-Glutamyl-D-Glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters (Ib), die der Synthese des L-L-Startdipeptids (Ia) genau nachgebildet war, nahm folgenden Weg. Carbobenzoxy-D-glutaminsäure- γ -hydrazid (IV) wurde über das (nicht isolierte) Azid (V) mit D-Glutaminsäure- γ -benzylester (VI) zum Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- γ' -benzylester (VII) gekoppelt. Das unmittelbar anfallende kristalline Produkt war erwartungsgemäss¹⁵ mit wenig Carbobenzoxy- α -D-glutamyl-D-glutaminsäure- γ' -benzylester (IX) verunreinigt, der sich auch

¹⁵ H. Sachs und E. Brand *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4608, 4610 (1953).

durch wiederholtes Umkristallisieren nicht vollständig entfernen liess. Diese Beobachtung, die selbstredend auch für das vollkommen analog aufgebaute L-L-Produkt VII zustimmt,¹² steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Waley,¹⁴ der darüber berichtete, dass bei der Umsetzung des L-Säureazids V mit dem L-Benzylester VI zum Derivat VII des L-L-Startdipeptids das strukturisomere L-L-Derivat IX nicht mitentsteht bzw. im kristallin anfallenden Umsetzungsprodukt nicht enthalten ist. Trotz der erwähnten geringen Verunreinigung des Produktes VII konnte die Synthese erfolgreich weitergeführt werden. Es folgte nämlich als nächster Schritt die Umsetzung des Produktes VII (in Methanol-Lösung) mit Diazomethan zum Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethyl- γ' -benzylester (VIII), der gleich kristallin anfiel und aus Methanol sehr gut umkristallisiert werden konnte, wobei das Umsetzungsprodukt der strukturisomeren Komponente, der Carbobenzoxy- α -D-glutamyl-D-glutaminsäure- $\gamma\alpha'$ -dimethyl- γ' -benzylester (X), fast ganz in den Mutterlaugen zurückblieb. Die Hydrogenolyse (Pd-Tierkohle, Methanol) des Derivates VIII lieferte schliesslich den γ -D-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester, d.h. das D-D-Startdipeptid (Ib), dessen papierchromatographische Untersuchung darauf hinwies, dass die Beimengung der strukturisomeren Verbindung XI höchstens 0,5% beträgt. Wie auch Waley¹⁴ fand, enthält das kristalline L-L-Startdipeptid (Ia) 1 Mol. Kristallwasser.¹² Wir haben in Gegensatz zu Waley festgestellt, dass man das



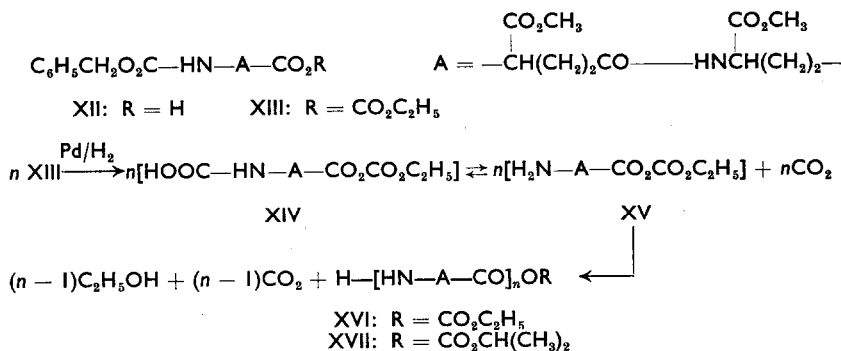
Kristallwasser durch einfaches Trocknen—es sei denn in der Vakuumpistole bei mässiger Temperatur—nicht ohne sekundäre Veränderung der Substanz entfernen kann.¹² Es ist selbstredend, dass dies auch für das D-D-Startdipeptid (Ib) zutrifft.

Auf die oben geschilderte Weise wurde auch das L-D-Startdipeptid, d.h. der γ -L-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (Ic) aufgebaut; der erste Schritt bestand aus der Umsetzung des aus dem Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -hydrazid (IV) frisch bereiteten L-Azids (V) mit D-Glutaminsäure- γ -benzylester (VI) zum Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-D-glutaminsäure- γ' -benzylester (VII). Sämtliche Zwischenprodukte waren auch hier—mit Ausnahme des nicht isolierten L-Azids (V)—gut kristallisierende Verbindungen.

UMSETZUNG DER STEREOISOMEREN STARTDIPEPTIDE ZU
 γ -POLY-GLUTAMINSÄURE- α -METHYLESTERN (II) DEN
 ENTSPRECHENDEN STEREOISOMEREN FORMEN

Die zum Polyester (II) führende intermolekulare Polyacylierung der bifunktionellen Startdipeptide (I) konnte nach Umsetzung der Carboxyl- bzw. Aminogruppe zu einer reaktionsfähigeren Gruppe leicht bewirkt werden. Diese Aktivierung, die fallweise gleich mit der intermolekularen Umsetzung verbunden war, erfolgte beim L-L-Startdipeptid (Ia) auf viererlei Weise (Methoden 1–4). Auf das kostspieligere D-D-Startdipeptid (Ib) und L-D-Startdipeptid (Ic) wurden nur zwei bzw. eine Methode (Methode 2 und 4, bzw. Methode 2) übertragen.

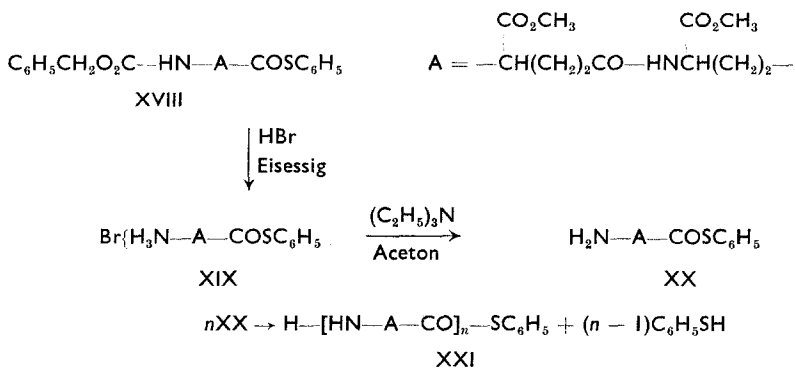
(1) *Die erste Methode* stellt eine sinngemässe Abänderung eines bereits mitgeteilten Verfahrens¹² dar: Aus dem L-L-Startdipeptid (Ia) wurde zuerst der Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XII) bereitet und dieser in eiskalter Dimethylformamid-Lösung nach der Methode von Boissonnas¹⁶ mit Chlorameisensäureäthylester in Gegenwart von 1 Mol. Triäthylamin zum gemischten Esteranhydrid XIII umgesetzt. Das letztere Produkt wurde gleich in seiner eiskalten Lösung nach Zusatz von Pd-Tierkohle einer Hydrogenolyse unterworfen. Diese wurde nicht im geschlossenen Gefäss, sondern—aus Gründen, die a.a.O.¹² bereits erörtert worden sind—mit durchströmendem Wasserstoff durchgeführt. Die CO₂-Abgabe, die im entweichenden Gas bestimmt wurde, kam bei 1 Mol. nicht zum Stillstand, ein Zeichen dafür, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nur die Hydrogenolyse der Carbobenzoxygruppe (XIII \rightarrow XIV \rightarrow XV) stattfindet, sondern auch schon die intermolekulare Polyacylierung des entstandenen bifunktionellen Derivats XV einsetzt (XV \rightarrow XVI). Um den letzteren Vorgang zu fördern, wurde—nachdem die CO₂-Abgabe (insgesamt 1,36 Mol.) praktisch beendet war—das Reaktionsgemisch nach Zusatz von 1 Mol. Triäthylamin gelinde erwärmt (60°). Es ist anzunehmen, dass das gemischte Anhydrid XV nicht nur die Acylgruppe des L-L-Startdipeptids (H₂N—A—CO—), sondern—wenn auch in geringerem Masse—seine Carbäthoxygruppe an eine Aminogruppe zu übertragen vermag. Im letzteren Falle erleidet jedoch die intermolekulare Polyacylierung einen Abbruch, da die N-Carbäthoxygruppe nicht hydrogenolysiert werden kann. Wenngleich dieser vorzeitige Abbruch der intermolekularen Polyacylierung nicht vermieden werden konnte, zeigten doch die Versuchsergebnisse, dass das polydisperse Umsetzungsprodukt (XVI) auch Komponenten verhältnismässig hohen Molekulargewichtes enthält.



¹⁶ R. A. Boissonnas *Helv. Chim. Acta* **34**, 874 (1951).

Ausgehend von der Beobachtung von Boissonnas und Schuman,¹⁷ dass die Esteranhydridbildung aus einem Carbonsäureanion und Chlorameisensäureester durch die gleichzeitige Anwesenheit von freien Aminogruppen nur unwesentlich beeinträchtigt wird, liess sich das oben erörterte Verfahren wesentlich vereinfachen, indem auf die vorübergehende Blockierung der Aminogruppe des L-L-Startdipeptids (Ia → XII) zwecks Herstellung des gemischten Esteranhydrids XV verzichtet werden konnte. Die Bildung des Polyesters XVI findet auch dann statt, wenn eine eiskalte Dimethylformamid-Lösung des L-L-Startdipeptids (Ia) zuerst mit 1 Mol. Triäthylamin und 1 Mol. Chlorameisensäureäthylester versetzt (Ia → XV) und dann—nach Zusatz eines zweiten Mol. Triäthylamins—gelinde erwärmt wird (XV → XVI). Es ist zu bemerken, dass nach Abdampfen des Lösungsmittels der Polyester in wasserlöslicher Form gewonnen wurde und somit gegen Wasser dialysiert werden konnte. Um die Wahrscheinlichkeit der N-Carbalkoxylierung in der zweiten Reaktionsphase zu vermindern, wurde in einem anderen Versuch anstatt Chlorameisensäureäthylester der Isopropylester angewandt,¹⁸ zugleich wurde hier vor der Reaktion die Dimethylformamid-Lösung des L-L-Startdipeptids (Ic) durch eine azeotrope Destillation mit Toluol entwässert. Die Bildung des Polyesters (XVII) verlief auch hier glatt, doch nahm die Ausbeute nur unwesentlich zu (43,5%, gegen 38,5% d.Th.). Es wurde aber gefunden, dass aus diesem Polyester die durch Dialyse gereinigte freie Polysäure in etwas besserer Ausbeute gewonnen werden konnte (s. Tabelle 2), ein Zeichen dafür, dass dieser Polyester einen grösseren Anteil an höhermolekularen Komponenten enthält.

(2) Die zweite Methode, die von der Peptid- bzw. Polypeptidsynthese von Wieland und Bernhard¹⁹ Gebrauch macht, wurde auf alle drei stereoisomeren Startdipeptide übertragen. Demgemäss wurde das Carbobenzoxy-derivat des L-L-, D-D-, bzw. L-D-Startdipeptids (XII aus Ia, Ib bzw. Ic) über das gemischte Anhydrid XIII mit Thiophenol zum Thiophenylester XVIII umgesetzt und aus diesem mit Eisessig-Bromwasserstoff²⁰ das Hydrobromid des Startdipeptid-thiophenylesters (XIX) bereitet. Wird dessen Aminogruppe mit Triäthylamin in Aceton-Lösung freigesetzt, so erleidet das primär entstehende Produkt XX eine zur Bildung des Polyesters XXI führende intermolekulare Polyacylierung, die durch Erwärmen gefördert werden kann:



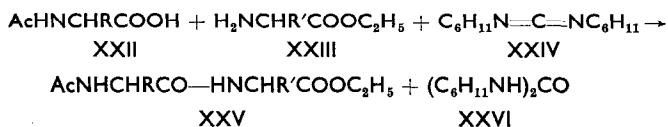
¹⁷ R. A. Boissonnas und J. Schuman *Helv. Chim. Acta* **35**, 2229 (1952).

¹⁸ Th. Wieland und H. Bernhard *Liebigs Ann.* **572**, 190 (1951); J. R. Vaughan, Jr. und R. L. Osato *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 676 (1952).

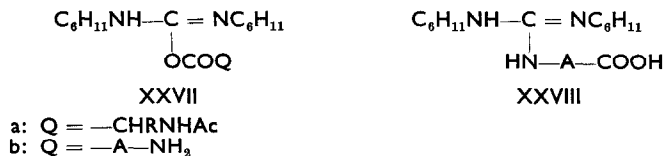
¹⁹ Th. Wieland und H. Bernhard *Liebigs Ann.* **582**, 218 (1953).

²⁰ D. Ben-Ishai und A. Berger *J. Org. Chem.* **17**, 1564 (1952); R. A. Boissonnas und G. Preitner *Helv. Chim. Acta* **35**, 2240 (1952); R. Schwyzer *Ibid.* **37**, 155 (1954).

(3) *Die dritte Methode* beruhte auf einer Methode, die zuerst Sheehan und Hess²¹ bei der Synthese von Di- und Tripeptiden angewandt haben. Wie bekannt, lässt sich nach diesem Verfahren z.B. ein Dipeptid derart herstellen, dass eine Aminosäure mit geschützter (z.B. acylierter) Aminogruppe (XXII) und ein Aminosäureester (XXIII) mit Hilfe von *Dicyclohexylcarbodiimid* (XXIV) kondensiert wird. Die Reaktion verläuft in Lösung schon bei Raumtemperatur, wobei neben dem Dipeptidderivat (XXV) als Beiprodukt *Dicyclohexylharnstoff* (XXVI) entsteht:

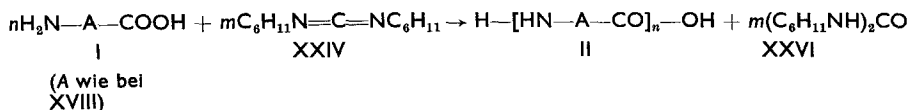


Der Mechanismus der kondensierenden Wirkung des *Dicyclohexylcarbodiimids* (und anderer Carbodiimide) konnte Khorana²² aufklären. Es handelt sich um eine Aktivierung der Carboxylgruppe, deren erste Phase darin besteht, dass das Carbodiimid die Reaktionskomponente mit freier Carboxylgruppe anlagert, wodurch ein O-acyliertes *iso*-harnstoffderivat (XXVIIa) gebildet wird, das schon selbst seine Acylgruppe auf Aminogruppen zu übertragen vermag.



Man konnte vermuten, dass sich diese, zur Ausgestaltung einer einzigen Peptidbindung dienende Methode auch zur Polyautokondensation des bifunktionellen Startdipeptids (I) heranziehen liesse, vorausgesetzt, dass die freie Aminogruppe—trotz ihres nukleophilen Stickstoffatoms—die Entstehung des reaktionsfähigen Zwischenproduktes (XXVIIb) nicht in entscheidendem Mass verhindert. Eine derartige Konkurrenzreaktion würde nämlich zur Bildung eines vermutlich stabilen Guanidinderivates (XXVIII) führen und somit einen gänzlichen bzw. vorzeitigen Abbruch des intermolekularen Polyacylierungsvorganges mit sich bringen.

Nun zeigten Modellversuche, die mit *Dicyclohexylcarbodiimid* und verschiedenen primären Aminen durchgeführt wurden, dass die Bildung von Guanidinderivaten unter den Versuchsbedingungen, die bei der Polyautokondensation der Startdipeptide (I) angewandt wurden (s. unten), kaum vor sich geht. Dies bestätigen auch die Versuche, die mit dem L-L- bzw. D-D-Startdipeptid (Ia bzw. Ib) selbst durchgeführt wurden: löst man in der Dimethylformamid-Lösung des Startdipeptids (I) *Dicyclohexylcarbodiimid* (XXIV), so erfolgt selbst bei Raumtemperatur schon nach einigen Minuten—als Zeichen einer Polyautokondensation—die kristalline Ausscheidung von *Dicyclohexylharnstoff* (XXVI):



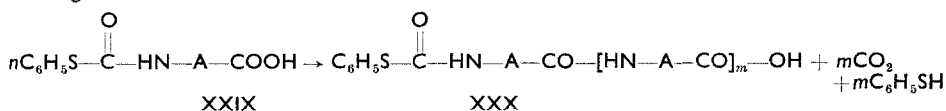
Das Filtrat enthielt den γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa) bzw. den γ -Poly-D-glutaminsäure- α -methylester (IIb), der zur entsprechenden Polysäure verarbeitet worden konnte.

²¹ J. C. Sheehan und G. P. Hess *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1077 (1955).

²² H. G. Khorana *Chem. & Ind. (Rev.)* 1087 (1955).

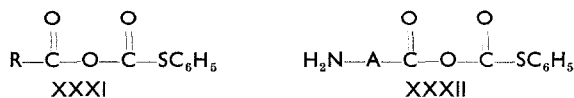
Es sei hier bemerkt, dass die Carbodiimid-Methode zur Herstellung von monotonen Polypeptiden das erste Mal an Hand der Synthese der $\alpha\gamma$ -Poly-glutaminsäure erprobt wurde.¹⁰

(4) Die vierte Methode wurde aus der Polypeptidsynthese von Noguchi und Hayakawa²³ entwickelt. Nach dem ursprünglichen Verfahren der japanischen Forscher wird ein Oligopeptidester zuerst mit Chlorthioameisensäure-phenylester (ClCOSC₆H₅) zum N-Carbothiophenylderivat umgesetzt, dann die Estergruppe sauer verseift und zum Schluss die Benzol-Pyridin Lösung des N-Carbothiophenyl-oligopeptids (XXIX) erwärmt, wobei die Bildung des Polypeptids (XXX) unter Abspaltung von Kohlendioxyd und Thiophenol vor sich geht. Wie bekannt, handelt es sich hier um die Aktivierung der Aminogruppe; der zum Polypeptid führende Umsatz lässt sich folgend formulieren:



Formal betrachtet bildet sich hier ein Polypeptid, dessen (endständige) Aminogruppe carbothiophenyliert vorliegt, doch können solche Gruppen schon durch einen milden alkalischen Eingriff zu freien Aminogruppen regeneriert werden.

Vorversuche zeigten, dass in Gegenwart von Triäthylamin auch eine Carboxylgruppe mit Chlorthioameisensäurephenylester "aktivierbar" ist, wobei zunächst ein gemischtes Anhydrid vom Typ XXXI entstehen dürfte. Es war somit zu erwarten, dass sich das Verfahren von Noguchi und Hayakawa unmittelbar auf das Startdipeptid (I) übertragen liesse, dass also beim Umsatz des Startdipeptids mit Chlorthioameisensäure-phenylester in Gegenwart von Triäthylamin ausser dem N-Carbothiophenyl-Startdipeptid (XXIX; A = wie bei XVIII) auch das gemischte Anhydrid XXXII entstehen kann, das—ebenso wie das N-Carbothiophenyl-Startdipeptid (XXIX)—



einer intermolekularen Polyacylierung fähig wäre. Versuche, die mit dem L-L-Startdipeptid (Ia) durchgeführt wurden, zeigten nun folgendes: wird eine Suspension des L-L-Startdipeptids in eiskaltem, triäthylaminhaltigem Chloroform mit einer nahezu äquimolekularen Menge von Chlorthioameisensäurephenylester versetzt und das Gemisch geschüttelt, so geht ein erheblicher Teil des angesetzten Startdipeptids unter Selbsterwärmung des Gemisches sofort in Lösung. Aus der Lösung lässt sich ein farbloses Produkt ("primäres Umsetzungsprodukt") isolieren; wird die Benzol-Pyridin-Lösung dieser Substanz erwärmt (90°), so erfolgt allmählich die Ausscheidung einer hochmolekularen Substanz, die nach ihren Eigenschaften und analytischen Daten den γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa) darstellt.

Da das labile "primäre Umsetzungsprodukt", das vermutlich uneinheitlich ist, bisher einwandfrei nicht definiert werden konnte, haben wir zur Klärung der sich hier abspielenden Reaktionen mit weiteren Untersuchungen begonnen, über die später berichtet werden soll. Einstweilen sei nur bemerkt, dass der ganze Vorgang viel verwickelter ist. Gemischte Anhydride des Typs XXXI sind nämlich nicht zu fassen, da sie sich sofort nach ihrer Entstehung zu Carbonsäureanhydriden (XXXIII)

²³ J. Noguchi und T. Hayakawa *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 2846 (1954).

umlagern. Es ist anzunehmen, dass diese Umlagerung mit einer Disproportionierung verbunden ist die im Sinne der Gleichung XXXI \rightarrow XXXIII + XXXIV verläuft:



Das bisher unbekannte Anhydrid XXXIV, dessen Existenzfähigkeit sehr fraglich erscheint, dürfte durch Aminogruppen sofort abgefangen werden, wobei nebst Kohlendioxyd und Thiophenol ein N-Carbothiophenylderivat (Typ XXIX) entstehen müsste. Es wird an anderer Stelle²⁴ erörtert, welche Vorstellungen man sich über die Zusammensetzung des "primären Umsetzungsproduktes" und über den Mechanismus seiner Umsetzung zum Polyester (IIa) machen kann.

Als Ergänzung zu den oben erörterten vier Methoden sei nochmals darauf hingewiesen, dass unabhängig von uns auch Waley¹⁴ die Synthese des L-L-Startdipeptids (Ia) verwirklicht hat. Es wurde von ihm auch eine Polyautokondensation des L-L-Startdipeptids zum γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa) durchgeführt, und zwar mit Hilfe von Tetraäthylpyrophosphit, d.h. nach einer Methode, die zuerst von Anderson *et al.*²⁵ zu Peptidsynthesen herangezogen wurde. Es ist zu bemerken, dass die γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa), die Waley¹⁴ durch Verseifung des Polyesters gewonnen hat, 0,6% gebundenen Phosphor enthält. Wir haben das Verfahren genau reproduziert und gefunden, dass es weniger befriedigend ist, als die Methoden 1-4. Es sei noch bemerkt, dass Waley bisher weder über die Synthese des D-D-Startdipeptids (Ib) und L-D-Startdipeptids (Ic), noch über deren Polyautokondensation berichtet hat.

VERGLEICHENDER ABBAU DES SYNTHETISCHEN γ -POLY-L-GLUTAMINSÄURE- α -METHYLESTERS

Um einen entsprechenden Vergleich mit dem mit Methanol veresterten APP und SPP zu haben, wurde der nach dem zweiten Verfahren gewonnene γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa) mit flüssigem Ammoniak in das entsprechende Polyamid (IIa; R = NH₂ anstatt R = OCH₃) umgewandelt, dann dieses dem Hofmann'schen Abbau unterworfen und danach sofort mit Salzsäure hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat konnte β -Formylpropionsäure in Form ihres *p*-Nitrophenylhydrazons isoliert werden, hingegen liess sich das für die α -Glutamylobindung charakteristische Abbauprodukt,^{8,9} die $\alpha\gamma$ -Diaminobuttersäure nicht nachweisen. Wie bekannt,⁷ kam man beim gleichen Abbau des aus dem APP oder SPP hergestellten Polymethylesters zu demselben Ergebnis, was als ein Beweis des Vorherrschens der γ -Glutamylobindungen betrachtet wurde.

HERSTELLUNG DER γ -POLY-GLUTAMINSÄUREN AUS DEN ENTSPRECHENDEN POLYESTERN

Es wurde bereits erwähnt, dass zwecks Herstellung der freien Polysäuren die auf verschiedenen Wegen gewonnenen Polyester alkalisch verseift und die Polysäuren über ihre schwerlöslichen Kupfer(II)salze isoliert wurden. Man kann damit rechnen, dass im Laufe dieser Operationen auch endständige Carboxyl- und Aminogruppen freigesetzt werden, die im synthetischen Polyester noch blockiert vorliegen dürften (z.B. XVI, XXI, XXX), doch ist eine Regenerierung von Aminogruppen, die im Laufe des dritten Verfahrens Guanidgruppen (Typ XXVIII) etwa anteilig geworden sind, kaum zu erwarten.

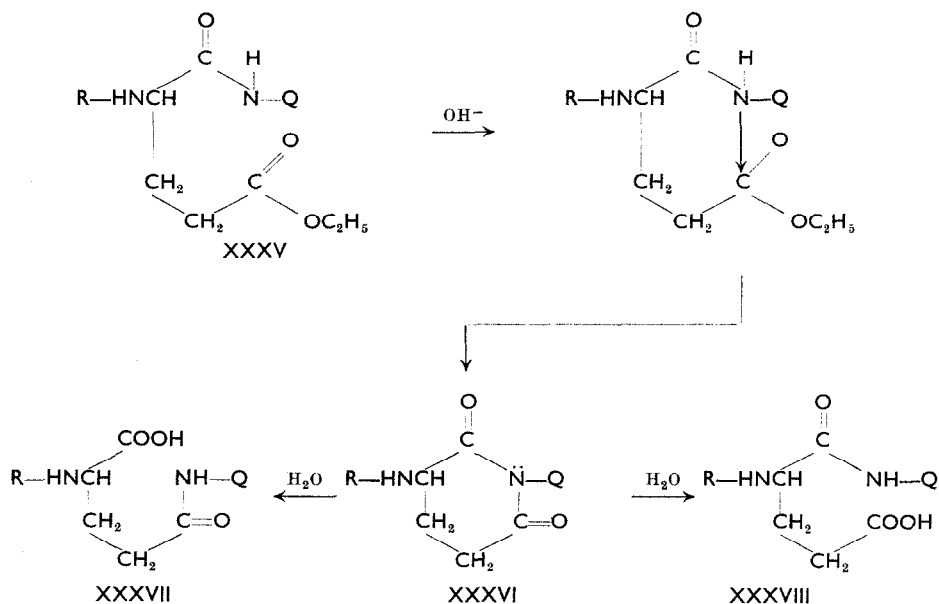
Die auf oben angegebene Weise gewonnenen stereoisomeren γ -Poly-glutaminsäuren, d.h. die γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa), γ -Poly-D-glutaminsäure (IIIb) und die

²⁴ V. Bruckner und J. Kovács *Hung. Acta Chim.* **12**, 363 (1957).

²⁵ G. W. Anderson, J. Blondiger und A. D. Welcher *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5309 (1952).

mesoide γ -Poly-glutaminsäure (IIIc), stellen schneeweisse, flaumartige Produkte dar, die in Wasser sehr leicht löslich sind; sie zeigen keine Biuretreaktion und ihre Ninhydrinreaktion ist im Vergleich zur γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure nur sehr schwach positiv (quantitative Angaben s. im Versuchsteil). All diese Eigenschaften kommen auch dem APP und SPP zu.

Es drängt sich hier die Frage auf, ob die alkalische Verseifung der γ -Poly-glutaminsäure- α -methylester etwa nicht von einer innermolekularen, partiellen $\alpha \rightarrow \gamma$ -Transpeptidierung begleitet wird. Battersby und Robinson²⁶ haben nämlich gefunden, dass die alkalische Verseifung des Äthylesters des N-Acetyl-diglycyl- α -L-glutamyl-glycinhexylamids (Teilformel: XXXV) mit einer weitgehenden $\alpha \rightarrow \gamma$ -Transpeptidierung (und vollständigen Racemisierung) verbunden ist, so dass ein Gemisch der strukturisomeren Peptide XXXVII und XXXVIII entsteht, in welchem das Derivat mit γ -Glutamylbindung (XXXVII) sogar vorherrscht. Dieser Vorgang lässt sich so deuten, dass durch einen übergänglichen Ringschluss ein 2:6-Diketopiperidinderivat (XXXVI) entsteht, welches—als sekundäres Säureamid—an zwei verschiedenen Stellen eine hydrolytische Ringsprengung (XXXVII \leftarrow XXXVI \rightarrow XXXVIII) erleidet:



Hierzu sei bemerkt, dass die innermolekulare Transpeptidierung von strukturisomeren Glutamylpeptiden (Typ XXXVII und XXXVIII) mit freier Carboxylgruppe—allerdings mit Hilfe einer anderen Methode—in unserem Institut schon früher durchgeführt wurde,²⁷ und zwar in beiden Richtungen ($\alpha \rightleftharpoons \gamma$). Dabei wurden die intermediären Ringverbindungen (Typ XXXVI) in kristalliner Form gefasst und ihre (auf Einwirkung von verdünnter Lauge) in zwei Richtungen verlaufende hydrolytische Ringöffnung (XXXVII \leftarrow XXXVI \rightarrow XXXVIII) streng bewiesen.²⁸

²⁶ A. R. Battersby und J. C. Robinson *Chem. & Ind. (Rev.)* 45 (1954); *J. Chem. Soc.* 259 (1955).

²⁷ K. Medzihradsky erörtert in einem Vortrag von V. Bruckner und J. Kovács erschienen in *Magyar Tud. Akadémia VII. Osztályának Közleményei* 3, 105 (1952).

²⁸ J. Kovács, K. Medzihradsky und V. Bruckner *Naturwissenschaften* 41, 450 (1954); *Hung. Acta Chim.* 6, 183 (1955).

Da nun bei dieser Transpeptidierung nach unserer Erfahrung²⁸ immer ein Gemisch entsteht, in welchem die γ -Glutamylverbindung (XXXVII) in rund zehnfacher Menge die α -Glutamylverbindung (XXXVIII) überwiegt, so wird man mit einer *weitgehenden* $\gamma \rightarrow \alpha$ -Transpeptidierung bei der Verseifung der γ -Poly-glutaminsäure- α -methylester keinesfalls rechnen müssen. Überdies, ist die $\gamma \rightarrow \alpha$ -Transpeptidierung hier auch dadurch erschwert, dass bei der Näherung der veresterten Carboxylgruppe eines γ -Glutamylrestes (XXXVII, COOCH_3 statt COOH) zum betreffenden Stickstoffatom zwei lange Ketten (R und Q) mitschwingen müssen. Umgekehrt, wird man damit rechnen müssen, dass bei der alkalischen Verseifung eines α -Poly-glutaminsäure- γ -esters (Teilformel: XXXV) die nötige Kettenschwingung leichter erfolgt und somit auch schon aus diesem Grund eine $\alpha \rightarrow \gamma$ -Transpeptidierung viel leichter vor sich gehen kann.

In Übereinstimmung mit diesen Folgerungen hat Volcani²⁹ gefunden, dass ein von ihm isoliertes, γ -L-Glutamylbindungen spezifisch spaltendes Enzym unsere synthetische γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa) bis zu 95% zu L-Glutaminsäure abbaut. Dies kann als ein Beweis dessen betrachtet werden, dass in diesem synthetischen Produkt α -Glutamylbindungen nur in sehr niedrigem Prozentsatz anwesend sein dürften, ferner auch, dass eine nennenswerte Racemisierung im Laufe der Synthese nicht stattgefunden hat.

Übrigens wurde die optische Reinheit einiger unserer Endprodukte auch durch ihre vollständige salzsaure Hydrolyse geprüft; das spezifische Drehungsvermögen der entstandenen Glutaminsäure war nur ein wenig geringer als dasjenige optisch reiner L- bzw. D-Glutaminsäure. Diese Versuche müssen noch mit grösseren Ansätzen wiederholt und auf sämtliche Endprodukte erstreckt werden. Es sei hier gleich bemerkt, dass die nach der zweiten Methode gewonnene γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa) in Wasser den spez. Drehwert $[\alpha]_4^{20} = -23,8^\circ$ zeigte, während der spez. Drehwert ihres natürlichen Antipoden (IIIb), d.h. des APP's in Wasser $[\alpha]_D^{20} = +23,5^\circ$ beträgt. Diese vorzügliche Übereinstimmung ist kaum als strenger Beweis der optischen Reinheit des synthetischen Produktes zu betrachten, da der spez. Drehwert auch vom Molekulargewicht der Polysäure abhängen dürfte, einwandfreie Molekulargewichtsbestimmungen jedoch noch nicht durchgeführt wurden (s. unten).

Wie bei allen Synthesen hochmolekularer Stoffe, entstanden auch in unseren Fällen polydisperse Produkte. Es wurde darauf Gewicht gelegt, dass aus diesen Gemischen durch andauernde Dialyse—es sei denn auf Kosten der Ausbeute—Präparate je höheren durchschnittlichen Molekulargewichtes abgesondert werden, die papierchromatographisch (Phenol-Wasser) nicht mehr aufgeteilt werden können und fast unbewegt an der Startstelle verbleiben. Zuverlässige Bestimmungen der Molekulargewichte unserer Produkte stehen noch aus, es wurde einstweilen nur aus ihren Aminostickstoffwerten (van Slyke) auf ihr durchschnittliches Molekulargewicht geschlossen, ebenso wie dies früher beim APP und SPP geschah. Die Aminostickstoffwerte unserer synthetischen Endprodukte schwankten—vom Ausmass der Dialyse abhängig, das wegen Materialmangels fallweise eingeschränkt werden musste—zwischen 0,16 und 1,5% (bei der *mesoiden* Polysäure (IIIc) konnte wegen Materialmangels bisher nur ein Präparat vom Aminostickstoffwert 2,9% gewonnen werden), während die Aminostickstoffwerte von APP und SPP Präparaten ursprünglicher

²⁹ Briefliche Mitteilung von Dr. B. E. Volcani, The Weizmann Institute of Science, Rehovoth, Israel vom 24 Juni (1956).

Isolierungsart¹ eine ziemliche Konstanz (0,18–0,20%) zeigten. Infolge der Spaltung der N-endständigen γ -Glutamylbindung, die bei der van Slyke-schen Bestimmung—wenigstens im Falle von Oligopeptiden—beobachtet wurde,³⁰ sind die durchschnittlichen Molekulargewichte, die aus den Aminostickstoffwerten berechnet werden, wahrscheinlich bis zur Irrealität nach tieferen Werten hin verzerrt. Welches Ausmass diese Verzerrung erreichen kann, wird an anderer Stelle²⁴ gezeigt. Trotzdem kann man aber aus den Aminostickstoff-werten der natürlichen Polyglutaminsäuren ursprünglicher Isolierungsart¹ das *Verhältnis* ihrer durchschnittlichen Molekulargewichte einigermaßen abschätzen,—vorausgesetzt, dass die van Slyke'sche Bestimmung bei sämtlichen Proben ganz genau unter ein und denselben Versuchsbedingungen durchgeführt wird. Diese vergleichende Abschätzung des relativen Molekulargewichtes ist bei den Naturprodukten deshalb zulässig, weil sie praktisch homodispers sind. Hingegen ist bei den polydispersen synthetischen Produkten dieser Vergleich (es sei denn mit einander, oder mit dem APP bzw. SPP) kaum statthaft, umso mehr da hier das durchschnittliche Molekulargewicht ohne Kenntnis der quantitativen Verteilung der einzelnen Komponenten keinen realen Wert hat. Wenn man jedoch von der etwaigen Anwesenheit von *cyclo*Peptiden absieht, so wird man—ohne einen groben Fehler zu begehen—annehmen können, dass z.B. eine synthetische, polydisperse γ -Poly-glutaminsäure vom Aminostickstoffwert 0,5% (ber. Molekulargewicht 2800) auch Komponenten enthalten dürfte, deren Molekulargewichte dasjenige des Naturproduktes (Aminostickstoffwert 0,2%, ber. Molekulargewicht 7000) schon erreichen. Dabei ist zu vermuten, dass das reale Molekulargewicht auch etwa das Sechsfache des Wertes betragen kann, der aus dem nach der van Slyke'schen Methode ermittelten Aminostickstoffgehalt berechnet wurde.²⁴

Wir beabsichtigen die einwandfreie Bestimmung des durchschnittlichen Molekulargewichtes auf anderen Wegen in der Kürze durchzuführen. Zur Zeit sind auch Versuche mit grösseren Ansätzen im Gange, deren erstes Ziel die Gewinnung von γ -Poly-glutaminsäuren viel höheren Molekulargewichtes und einer besseren Annäherung der Homodispersität ist.

Solange die Versuche mit grösseren Ansätzen nicht abgeschlossen sind, lässt sich auch keine endgültige Entscheidung darüber treffen, welche von den angeführten vier Methoden der Synthese als die zuverlässigste zu bezeichnen ist, da bei dieser Beurteilung die Grösse des Molekulargewichtes, die (auf die Startdipeptide berechnete) Ausbeute und die sichere Reproduzierbarkeit gemeinschaftlich in Rechenschaft gezogen werden müssen. Überdies, muss auch die optische Reinheit sämtlicher Endprodukte an grösseren Substanzproben nachgeprüft werden. Nach den bisherigen Versuchsergebnissen, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind, scheint die erste Methode—bei Anwendung von Chlorameisensäure-i-propylester—die günstigste zu sein (Ausbeute 9,8% d.Th., auf das Startdipeptid berechnet; Aminostickstoff nach van Slyke 0,64%).

VERGLEICH DER STEREOISOMEREN γ -POLY-GLUTAMINSÄUREN MIT DEM APP BZW. SPP AUF SEROLOGISCHEM WEG

Herr Prof. Ivánovics (Mikrobiologisches Institut der Universität Szeged) hat die synthetischen, stereoisomeren γ -Poly-glutaminsäuren der serologischen Prüfung unterworfen und in dieser Beziehung auch Polyglutaminsäuren anderen Typs untersucht,

³⁰ H. Sachs und E. Brand *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 3601 (1954).

die ebenfalls in unserem Institut synthetisiert wurden. Über diese Untersuchungen berichtet Herr Prof. Ivánovics selbst ausführlich (s. im Anhang). Hier sei bloß soviel hervorgehoben, dass mit Antianthrax-Immunsereen Lösungen der γ -Poly-D-glutaminsäure—genau so wie Lösungen des APP's bzw. des SPP's—bis zu einer Verdünnung von 10^6 eine Präzipitationsreaktion zeigten, hingegen blieb diese Reaktion bei der γ -Poly-L-glutaminsäure aus. An Hand des serologischen Testes nach Ouchterlony³¹ wurde zugleich die Polydispersität der synthetischen Produkte nachgewiesen.

Es ist somit festzustellen, dass sämtliche Eigenschaften der synthetischen γ -Poly-D-glutaminsäure mit denen des Anthrax-Polypeptids übereinstimmen. Auf Grunde dessen und der früheren Abbauergebnisse⁷ kann man nun behaupten, dass das Anthrax-Polypeptid als γ -Poly-D-glutaminsäure (IIIb) anzusprechen ist. *Durch die Synthese dieser Polyglutaminsäure wurde erstmals die Vollsynthese eines natürlichen Haptens durchgeführt.*

Betreffs der Konstitution des Subtilis-Polypeptids ist es noch zu entscheiden, ob es sich hier um ein Gemisch von γ -Poly-D-glutaminsäure (IIIb) und γ -Poly-L-glutaminsäure (IIIa) handelt, oder ob Glutaminsäure-Bausteine entgegengesetzter Konfiguration in ein und derselben Polypeptidkette vergesellschaftet vorkommen. Nun zeigte nach Beobachtungen von Prof. Ivánovics auch die *mesoide* γ -Polyglutaminsäure (IIIc) eine positive serologische Reaktion. Dadurch scheint auch die Möglichkeit, dass in den Peptidketten des SPP's D- und L-Glutaminsäure-Bausteine vergesellschaftet vorkommen, nicht a priori ausgeschlossen zu sein.

Es sei noch betont, dass nur die γ -Poly-D-glutaminsäure und die *mesoide* γ -Polyglutaminsäure eine positive serologische Reaktion zeigte, während sich die bisher geprüften Polyglutaminsäuren anderer Konstitution als serologisch inaktiv erwiesen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Synthese der Startdipeptide (I) und ihrer carboxylaktivierten Derivate

(a) *Synthese des L-L-Startdipeptids (Ia) und seiner Derivate*

L-L-Startdipeptid; γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (Ia). Die Synthese dieser Verbindung haben wir¹² und unabhängig von uns Waley¹⁴ bereits beschrieben. Auf unterschiedliche Beobachtungen wurde im theoretischen Teil hingewiesen.

Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XII; L-L-Form). S. unsere frühere Arbeit.¹² Schmp. 109–110°. $[\alpha]_D^{20} = -28,3$ ($c = 11,8$; Methanol).

Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl- γ' -L-glutamylthiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XVIII; L-L-Form). Eine mit Eis gekühlte und gerührte Lösung von 3,49 g des Carbobenzoxy-L-L-Startdipeptids (XII) in 20 ml absol. Tetrahydrofuran wurde zuerst mit 1,12 ml absol. Triäthylamin, dann binnen 15 Min. tropfenweise mit einem Gemisch von 0,77 ml Chlorameisensäureäthylester und 2 ml absol. Tetrahydrofuran versetzt. Nach weiteren 15 Min. versetzte man das Gemisch, das mit Kristallen des ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorids durchsetzt war, binnen 30 Min. tropfenweise mit einer Lösung von 0,87 ml Thiophenol in 3 ml absol. Tetrahydrofuran, rührte danach bei Raumtemperatur noch 1 Stunde weiter und liess zum Schluss das Gemisch 14 Stunden stehen. Nun wurde das Gemisch bei Unterdruck (Bad 25°) zur Trockne gebracht, der Rückstand auf dem Filter zuerst mit insgesamt 140 ml Wasser, dann nach dem

³¹ Ö. Ouchterlony *Acta Path. Microbiol., Scand.* **26**, 507 (1949).

Trockensaugen mit 20 ml Petroläther gewaschen und schliesslich über Nacht im Vakuumexsiccator über P_2O_5 und Paraffin aufbewahrt. Dieses Rohprodukt (3,6 g) wurde zuerst aus 60 ml eines gleichteiligen Gemisches von Benzol und Petroläther umkristallisiert (Schmp. 124–126°). Nach einmaligem Umkristallisieren dieses Produktes wurden 2,73 g (64,6% d.Th.) einer analysenreinen Substanz vom Schmp. 134–135° gewonnen. $[\alpha]_{20}^D = -9,6^\circ$ ($c = 4,0$; Tetrahydrofuran).



Ber. C 58,85, H 5,7, N 5,3, CH_3O 11,7

Gef. C 59,0, H 5,7, N 5,7, CH_3O 11,9

Hydrobromid des γ -L-Glutamyl- γ' -L-glutamyl-thiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters (XIX; L-L-Form). Man löste 3,5 g des reinen L-L-Thiophenylesters XVIII in 35 ml absol. Eisessig-Bromwasserstoff (10% HBr), liess die Lösung unter Feuchtigkeitsausschluss 1 Stunde stehen, versetzte sie danach unter Rühren mit 100 ml absol. Äther, wobei sich das Hydrobromid XIX als klebriges Produkt ausschied. Nach dem Abgiessen der Flüssigkeit wurde das Produkt dreimal mit je 100 ml absol. Äther durchgearbeitet, wodurch es zu einem Pulver zerfiel. Dieses wurde noch zweimal mit je 50 ml absol. Äther (Aufschlännen, Abgiessen) gewaschen, dann im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet (3,0 g). Das Produkt ist sehr hygroskopisch. Kristallisationsversuche waren erfolglos.

(b) *Synthese des D-D-Startdipeptids (Ib) und seiner Derivate*

Carbobenzoxy-D-glutaminsäure- γ -Hydrazid (IV; D-Form). Die Verbindung wurde auf dieselbe Weise hergestellt wie das entsprechende Derivat der L-Glutaminsäure.¹² Aus D-Glutaminsäure-hydrochlorid (52 g) wurde zuerst das Hydrochlorid des D-Glutaminsäure- γ -methylesters (30 g; Schmp. 156–158°; $[\alpha]_D^{20} = -24,2^\circ$ ($c = 9,35$; Wasser), dann aus 28 g des Ester-hydrochlorids Carbobenzoxy-D-glutaminsäure- γ -methylester bereitet, der gleich im rohen Zustand mit Hydrazinhydrat umgesetzt wurde. Das zuerst anfallende, kristalline Carbobenzoxy-D-glutaminsäure- γ -hydrazid (27 g; 64% d.Th.) schmolz bei 168–169° (Zers.) und war zur weiteren Verarbeitung geeignet. Nach einmaligem Umkristallisieren aus wässrigen Alkohol (1 : 2) liess sich ein analysenreines Produkt gewinnen, das bei 177–178° schmolz. $[\alpha]_D^{20} = +11,5^\circ$ ($c = 10,75$; *n*-Salzsäure).



Ber. C 52,9, H 5,8, N 14,2

Gef. C 52,3, H 5,85, N 14,1

D-Glutaminsäure- γ -benzylester (VI; D-Form). Nach dem zur Herstellung des L-Stereoisomeren beschriebenen Verfahren¹² wurden aus 22 g D-Glutaminsäure 13,8 g (39% d.Th.) des aus Wasser einmal umkristallisierten D-Glutaminsäure- γ -benzylesters vom Schmp. 167–168° gewonnen, der zur weiteren Verarbeitung geeignet war. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Wasser blieb der Schmp. unverändert. $[\alpha]_D^{20} = -28,1^\circ$ ($c = 9,8$, *n*-Salzsäure).



Ber. C 60,8, H 6,3, N 5,9

Gef. C 60,65, H 6,2, N 5,9

Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- γ' -benzylester (VII; D-D-Form). Aus 23,7 g Carbobenzoxy-D-glutaminsäure- γ -hydrazid (IV) vom Schmp. 168–169° und 18,9 g D-Glutaminsäure- γ -benzylester (VI) auf analoge Weise bereitet wie das stereoisomere L-L-Produkt.¹² Ausbeute an unmittelbar anfallenden kristallinen Produkt 21,4 g (61% d.Th., nach Abrechnung des unverändert gebliebenen Benzylesters, 2,2 g). Schmp: Ziehend 153–159°, nach vorherigem Sintern bei 138°. Obzwar das Produkt mit der strukturisomeren Verbindung IX verunreinigt ist (s. im allgem. Teil und a.a.O.¹²) wurde es weiter verarbeitet. Zur Analyse wurde eine Probe (2 g) aus Alkohol (10 ml) einmal umkristallisiert. Schmp. 160–162°, nach vorherigem Sintern bei 156°. $[\alpha]_D^{20} = +6,7^\circ$ ($c = 4,7$; Methanol).



Ber.	C	60,0,	H	5,6,	N	5,6
------	---	-------	---	------	---	-----

Gef.	C	59,6,	H	5,7,	N	5,6
------	---	-------	---	------	---	-----

Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethyl- γ' -benzyl-ester (VIII; D-D-Form). Aus 7 g Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- γ -benzylester (VII) vom Schmp. 153–159° (s. oben) wurden nach dem bei der Herstellung der L-L-Form angewandten Verfahren¹² 5 g (67,7% d.Th.) der Substanz VIII vom Schmp. 116–117° gewonnen; sie wurde weiter verarbeitet. Zur Analyse wurde eine kleine Probe aus Methanol einmal umkristallisiert. Schmp. 119–120°. $[\alpha]_D^{20} = +7,3^\circ$ ($c = 4,9$; Essigester).

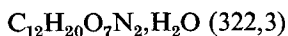


Ber.	C	61,35,	H	6,1,	CH ₃ O	11,7
------	---	--------	---	------	-------------------	------

Gef.	C	61,7,	H	6,1,	CH ₃ O	11,8
------	---	-------	---	------	-------------------	------

Die frühere Angabe¹² über den spez. Drehwert des L-L-Antipoden ist nach den jetzt durchgeführten Kontrollbestimmungen auf $[\alpha]_D^{20} = -7,1^\circ$ ($c = 5,5$; Essigester) zu korrigieren.

D-D-Startdipeptid: γ -D-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (Ib). Aus 8 g des obigen Produktes (VIII) vom Schmp. 116–117° wurden nach dem für die Herstellung des L-L-Startdipeptids (Ia) beschriebenen Verfahren¹² 3,1 g (64% d.Th.) des D-D-Startdipeptids (Ib) gewonnen. Das unmittelbar anfallende, mit Methanol-Äther, danach mit Äther gewaschene Kristallprodukt schmolz rasch erhitzt nach vorherigem Sintern bei 129–130°. Das so gewonnene Produkt enthält 1 Mol. Kristallwasser. $[\alpha]_D^{20} = +3,3^\circ$ ($c = 4,86$; Methanol). Die frühere Angabe¹² über den spez. Drehwert des L-L-Antipoden ist nach den jetzt durchgeführten Kontrollbestimmungen auf $[\alpha]_D^{20} = -3,2^\circ$ ($c = 4,72$; Methanol) zu korrigieren.



Ber.	C	44,7,	H	6,9,	N	8,7	CH ₃ O	19,25
------	---	-------	---	------	---	-----	-------------------	-------

Gef.	C	45,2,	H	6,75,	N	8,6	CH ₃ O	19,2
------	---	-------	---	-------	---	-----	-------------------	------

Prüfung der Einheitlichkeit der Verbindungen VII und VIII (D-D-Form), weiterhin des D-D-Startdipeptids (Ib). Je 0,3 g des Produktes VII (D-D-Form) vom Schmp. 160–162° und seines methylierten Derivates (VIII; D-D-Form) vom Schmp. 119–120° wurden

in 80 prozent. Essigsäure (25 ml) hydrogenolysiert (Pd-Tierkohle, 10% Pd), das Filtrat bei Unterdruck eingedampft und die beiden Rückstände, weiterhin 0,3 g des D-D-Startdipeptids (Ib) vom Schmp. 129–130° in je 50 ml Wasser gelöst. Je 0,01 ml dieser Lösungen wurden chromatographiert. Lösungsmittel: Eisessig-*n*-Butanol-Wasser 1 : 4 : 5; aufsteigende Chromatographie auf Macherey-Nagel Nr. 518-Papier; Entwicklung mit Ninhydrin. Substanz VII lieferte zwei etwas zusammengeschmolzene, durch ihre verschiedene Intensität unterscheidbare Flecke, $R_f = 0,21-0,24$, die auf die Anwesenheit von γ -D-Glutamyl-D-glutaminsäure und α -D-Glutamyl-D-glutaminsäure hindeuten. Substanz VIII lieferte einen sehr intensiv angefärbten Fleck des γ -D-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters ($R_f = 0,50$), weiterhin einem viel kleineren und nur ganz schwach angefärbten Fleck des α -D-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\gamma\alpha'$ -dimethylesters ($R_f = 0,34$). Bei Substanz Ib ist der Fleck $R_f = 0,50$ sehr intensiv angefärbt, während der bedeutend kleinere Fleck $R_f = 0,34$ eben nur die Empfindlichkeitsgrenze (etwa 0,2 γ) der Ninhydrinreaktion des α -D-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\gamma\alpha'$ -dimethylesters (XI) erreicht. Daraus folgt, dass diese Verunreinigung im D-D-Startdipeptid (Ib) vom Schmp. 129–130° unter 0,5% liegt.

Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XII; D-D-Form). Nach dem für die Carbobenzoxylierung des L-L-Startdipeptids angewandten Verfahren¹² wurden aus 2,65 g des D-D-Startdipeptids (Ib) 1,68 g (47% d.Th.) seines Carbobenzoxy-Derivats (XII) in analysenreinem Zustand gewonnen. Schmp. 109–110°. $[\alpha]_D^{20} = +28,3^\circ$ ($c = 9,8$; Methanol).

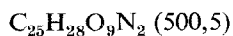
Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl- γ' -D-glutamyl-thiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XVIII; D-D-Form). Nach der Herstellungsart der stereoisomeren L-L-Verbindung (XVIII; L-L-Form) wurden aus 1,54 g des Carbobenzoxy-D-D-Startdipeptids 1,15 g (61,7% d.Th.) der D-D-Verbindung (XVIII) in analysenreinem Zustand gewonnen. Schmp. 133–135°.

Hydrobromid des γ -D-Glutamyl- γ' -D-glutamyl-thiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters (XIX; D-D-Form). Aus 1,1 g des D-D-Thiophenylesters XVIII wurde nach der Herstellungsart des Hydrobromids XIX der L-L-Form das rohe D-D-Hydrobromid (XIX) in Form eines hygroskopischen Pulvers in fast quantitativer Ausbeute gewonnen.

(c) *Synthese des L-D-Startdipeptids und seiner Derivate*

Sämtliche Schritte sind der Synthese des L-L-Startdipeptids bzw. D-D-Startdipeptids und seiner Derivate nachgebildet worden. Nachstehend wurden nur die Ansätze, Ausbeuten, die Art der Kristallisation, die Analysendaten und die physikalischen Konstanten angegeben.

Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-D-glutaminsäure- γ' -benzylester (VII; L-D-Form). Aus 11,8 g IV (L-Form) und 7,7 g VI (D-Form) 8 g (47% d.Th.) des Rohproduktes. Einmal umkristallisiert aus 180 ml Essigester-Äther (1 : 1) 5,24 g, aus der Mutterlauge weitere 2,2 g Schmp. 135–137°. Aus Essigester noch einmal umkristallisiert: Schmp. 137–138°. $[\alpha]_D^{20} = -1,12^\circ$ ($c = 8,9$; Methanol).



Ber.	C	60,0,	H	5,6,	N	5,6
Gef.	C	60,1,	H	5,5,	N	5,3

Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethyl- γ' -benzyl-ester (VIII; L-D-Form). Aus 7,4 g VII (L-D-Form) 4,1g (52% d.Th.) VIII (L-D-Form) vom Schmp.

104–107°. Aus absol. Essigester (12 ml) umkristallisiert 3,15 g vom Schmp. 107–108,5°. $[\alpha]_D^{20} = +0,95^\circ$ ($c = 11,5$; Aceton).



Ber.	C	61,35,	H	6,1,	N	5,3,	CH ₃ O	11,7
Gef.	C	61,6,	H	6,3,	N	5,3,	CH ₃ O	12,0

L-D-Startdipeptid; γ -L-Glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (Ic). Aus 3,1 g VIII (*L-D-Form*) 1,2 g (66% d.Th.) des aus Methanol (7 ml) einmal umkristallisierten *L-D-Startdipeptids*. Schmp. 143–144°. $[\alpha]_D^{20} = +38,6^\circ$ ($c = 5,5$; Methanol).



Ber.	N	9,2,	CH ₃ O	20,4
Gef.	N	9,4,	CH ₃ O	20,3

Die chromatographische Prüfung der Einheitlichkeit des Produktes erfolgte ebenso wie beim *D-D-Startdipeptid* und brachte dasselbe Ergebnis.

*Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-D-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XII; *L-D-Form*).* Aus 1 g *L-D-Startdipeptid* (Ic) 0,5 g (35% d.Th.) des kristallinen Rohproduktes; aus 4 ml absol. Essigester–Äther (1 : 1) zweimal umkristallisiert 0,35 g vom Schmp. 136–137°. $[\alpha]_D^{20} = +4,3^\circ$ ($c = 8,2$; Methanol).



Ber.	C	54,8,	H	6,0,	N	6,4
Gef.	C	55,0,	H	6,1,	N	6,7.

*Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl- γ' -D-glutamyl-thiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XVIII; *L-D-Form*).* Aus 3 g des *Carbobenzoxy-L-D-Startdipeptids* (XII; *L-D-Form*) fiel nach der Herstellungsart der stereoisomeren *L-L-Verbindung* (XVIII; *L-L-Form*) zuerst ein mit Kristallen durchsetztes Öl an. Dieses wurde in Essigester gelöst, die Lösung zuerst zwecks Entfernung des Triäthylammoniumchlorids mit Wasser ausgeschüttelt, dann getrocknet (Na₂SO₄) und schliesslich bei Unterdruck eingedampft. Der so gewonnene ölige Rückstand kristallisierte allmählich beim Verreiben mit absol. Äther. Das Kristallprodukt wurde zuerst aus absol. Methanol–Äther (1 : 4), dann aus absol. Methanol je einmal umkristallisiert. Das Produkt (0,65 g; 17,9% d.Th.) schmolz unscharf bei 97–100° nach vorherigem Sintern bei 94°. Wegen Materialmangels wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet.

*Hydrobromid des γ -L-Glutamyl- γ' -D-glutamylthiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylesters (XIX; *L-D-Form*).* Aus 0,62 g des *L-D-Thiophenylesters* XVIII wurde nach der Herstellungsart des Hydrobromids XIX der *L-L-Form* das rohe *L-D-Hydrobromid* (XIX) in Form eines hygroskopischen Pulvers in nahezu quantitativer Ausbeute gewonnen.

Umsetzung der stereoisomeren Startdipeptide (I) bzw. ihrer Derivate zum γ -Polyglutaminsäure- α -methylester entsprechender Konfiguration

Erste Methode

(a) *Herstellung des L-Polyesters (IIa, bzw. XVI) aus dem Carbobenzoxy-L-L-Startdipeptid (XII; L-L-Form).* In einem Zweihalskölbchen wurde eine Lösung von

1,46 g Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure- $\alpha\alpha'$ -dimethylester(XI I; L-L-Form) in 3 ml reinstem, wasserfreiem Dimethylformamid unter Feuchtigkeitsabschluss, nebst Eiskühlung und Rühren zuerst mit 0,47 ml absol. Triäthylamin, dann tropfenweise mit einem Gemisch von 0,32 ml Chlorameisensäureäthylester und 2 ml Dimethylformamid versetzt. Man rührte noch 10 Min. weiter, versetzte danach das Gemisch—das mit den Kristallen des ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorids durchsetzt war—mit 0,5 g Pd-Tierkohle (10% Pd), verband den einen Hals mit einem bis zum Boden des Kölbchens reichenden Gaseinleitungsrohr, den anderen durch eine vorgeschaltete, mit konz. Schwefelsäure beschickte Waschflasche mit einem abgewogenen Geissler'schen Kaliapparat. Jetzt liess man durch das Gemisch unter ständiger Eiskühlung einen langsamen Wasserstoffstrom (1 Blase per Sec.) streichen. Durch zeitweises Unterbrechen der Wasserstoffzufuhr und Abwägen des Kaliapparates konnte man feststellen, dass binnen 5 Stunden rund 1 Mol. (0,15 g) CO₂ abgegeben worden war. Da jedoch die CO₂-Abgabe bei diesem Stadium noch nicht zum Stillstand kam, wurde der Versuch weiter geleitet. Nach weiteren 2½ Stunden war die CO₂-Abgabe praktisch beendet und betrug insgesamt 1,36 Mol. (0,20 g). Jetzt wurde das Gemisch abgeschleudert, der Bodensatz einmal mit 3 ml Dimethylformamid durch Aufschlännen und Abschleudern ausgewaschen, die vereinigte Lösung nach Zusatz von 0,47 ml Triäthylamin 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann eine Stunde auf 60° erwärmt und schliesslich i. Vak. (20 mm) eingedampft (Bad 80°), wobei ein zähflüssiges, braunes Öl zurückblieb. Dieses wurde 8 mal mit je 40 ml absol. Äther gründlich zerrieben, dann im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt. Das so gewonnene, pulverisierbare Produkt, das vom anhaftenden Katalysator graustichig war, wog 177 mg (18,6% d.Th. auf das Carbobenzoxy-L-L-Startdipeptid, etwa 9,3% d.Th. auf das L-L-Startdipeptid berechnet). Das Rohprodukt (Polyester 1-a) wurde ohne Reinigung weiter verarbeitet.

(b) *Herstellung des L-Polyesters (IIa) unmittelbar aus dem L-L-Startdipeptid (Ia). Mittels Chlorameisensäureäthylester.* Eine Lösung von 2,0 g des L-L-Startdipeptids (Ia) in 11 ml Dimethylformamid wurde nebst Rühren und Kühlung (−4°) zuerst mit 0,87 ml Triäthylamin, dann tropfenweise mit einem Gemisch von 0,53 ml Chlorameisensäureäthylester und 3 ml Dimethylformamid versetzt. Man rührte noch 15 Min. weiter, nutschte dann das ausgeschiedene Triäthylammoniumchlorid rasch ab, wusch es zweimal mit je 2 ml Dimethylformamid nach und engte das mit der Waschflüssigkeit vereinigte Filtrat im Hochvakuum (Bad 0°) bis auf etwa 4 ml ein. Diese Lösung wurde nach Zusatz von 0,87 ml Triäthylamin 8 Stunden auf 40–60° erwärmt, dann über Nacht stehen gelassen, wobei eine geringe Kristallausscheidung erfolgte. Deren unbeachtet wurde das Gemisch i. Vak. (Bad 80°) ganz eingedampft, der Rückstand in 5 ml Methanol gelöst, die Lösung bei Unterdruck abermals abgedampft, und diese Prozedur noch einmal wiederholt. Das so gewonnene rötlich-braune, zähflüssige Öl (2,7 g) wurde in 15 ml Wasser gelöst, die Lösung gegen insgesamt 2 l. dest Wasser (in vier Ansätzen) 46 Stunden dialysiert (Cellophan), dann der Gefriertrocknung unterworfen und der feste Polyester 24 Stunden im Vakuumexsiccator über P₂O₅ aufbewahrt. Das sandfarbige, amorphe Produkt (Polyester 1-b) wog 688 mg (38,8% d.Th.); es wurde ohne Reinigung weiter verarbeitet.

	[C ₆ H ₉ O ₃ N] _n	[143,14] _n
Ber.	CH ₃ O	21,7
Gef.	CH ₃ O	22,0

Mittels Chlorameisensäure- α -propylester. Eine Lösung von 2,0 g des L-L-Startdipeptids in 12 ml absol. Dimethylformamid wurde nach Zusatz von 3 ml absol. Toluol i. Vak. (8 mm; Bad 50°) bis auf etwa 6 ml eingengt, dann die teilweise ausgeschiedene Substanz durch Zusatz von 6 ml Dimethylformamid durch gelindes Erwärmen wieder gelöst. Man versetzte die Lösung zuerst mit 0,87 ml Triäthylamin, hierauf—nebst starker Kühlung (Bad -10°)—tropfenweise und unter Rühren mit einem Gemisch von 0,72 ml Chlorameisensäure- α -propylester und 2 ml Dimethylformamid. Es wurde noch weitere 20 Min. unter Kühlung gerührt, dann Triäthylamin (0,87 ml) zugesetzt und nachher allmählich auf Raumtemperatur gebracht. Nun wurde die mit Kristallen (Triäthylammoniumchlorid) durchsetzte Lösung 3 Stunden auf 50°, dann 1 Stunde auf 70° erwärmt und nachher i. Vak. (10 mm) eingedampft. Der Rückstand wurde mit 30 ml absol. Äther verrieben und das Gemisch über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Nach Abgiessen des Äthers wurde das zähflüssige, mit Kristallen durchsetzte Produkt in 20 ml Methanol aufgenommen, das Gemisch bei Unterdruck scharf abgedampft und diese Prozedur noch einmal wiederholt. Der Rückstand wurde in 25 ml dest. Wasser gelöst, die Lösung zuerst gegen $3\frac{1}{2}$ l. dest. Wasser (in vier Ansätzen) 72 Stunden dialysiert (Cellophan), dann der Gefriertrocknung unterworfen. Das sandfarbige, amorphe Produkt (Polyester 1-b') wog 773 mg (43,5% d.Th.).



Ber. CH_3O 21,7

Gef. CH_3O 21,0

Zweite Methode

γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa, bzw. XXI). Eine Lösung von 3 g des rohen Hydrobromids XIX (L-L-Form) in 3 ml absol. Aceton wurde nach Zusatz von 1,8 ml absol. Triäthylamin nebst Feuchtigkeitsausschluss 24 Stunden sich selbst überlassen. Ungeachtet der kristallinen Ausscheidung (Triäthylammoniumbromid) wurde aus dem Gemisch mit Hilfe eines Heizbades (100°) der grösste Teil der Flüssigkeit abdestilliert, dann der ölige Rückstand unter Feuchtigkeitsausschluss 3 Stunden auf 100° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde der zähflüssige Rückstand mit 150 ml absol. Äther übergossen und 12 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Während dessen erhärtete sich das Produkt derart, dass es sich (unter Äther) zu einem feinen Pulver zerreiben liess. Dieses wurde abgeschleudert, dann in der Zentrifuge der Reihe nach dreimal mit je 70 ml Äther, dreimal mit je 30 ml Wasser, dreimal mit je 50 ml Aceton und schliesslich zewimal mit je 50 ml absol. Äther gewaschen. Das so gewonnene, fast farblose Produkt (L-Polyester 2) wurde zuerst an der Luft, dann im Vakuumexsiccator über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute 400 mg (21,2% d.Th. auf den carbobenzoxylierten Thiophenylester XVIII, etwa 6,8% d.Th. auf das L-L-Startdipeptid berechnet).



Ber. C 50,4, H 6,3, N 9,8, CH_3O 21,7

Gef. C 49,6, H 5,7, N 9,6, CH_3O 21,9

γ -Poly-D-glutaminsäure- α -methylester (IIb, bzw. XXI). Aus 1,1 g Carbobenzoxy- γ -D-glutamyl- γ' -D-glutamylthiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XVIII; D-D-Form) gewonnenes, rohes Hydrobromid XIX (D-D-Form) wurde auf die oben angegebene Weise

umgesetzt. Das gewonnene Produkt (D-Polyester 2) wog 139 mg (23,4% d.Th. auf den carbobenzoxylierten Thiophenylester XVIII, etwa 7,2% auf das D-D-Startdipeptid berechnet).

mesoide γ -Poly-glutaminsäure- α -methylester (IIc, bzw. XXI). Aus 620 mg Carbo-benzoxy- γ -L-glutamyl- γ' -D-glutamylthiophenol- $\alpha\alpha'$ -dimethylester (XVIII) gewonnenes, rohes Hydrobromid XIX (L-D-Form) wurde auf die oben angegebene Weise umgesetzt. Das gewonnene Produkt (L-D-Polyester 2) wog 220 mg (65,8% d.Th. auf den carbobenzoxylierten Thiophenylester XVIII, 4,1% d.Th. auf das L-D-Startdipeptid berechnet.)

Dritte Methode

γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa). In einer Lösung von 3,2 g (0,1 Mol.) des L-L-Startdipeptids (Ia) in 6,5 ml Dimethylformamid wurden 2,3 g (0,11 Mol.) frisch destillierten Dicyclohexylcarbodiimids gelöst. Es erfolgte eine starke Selbsterwärmung und nach etwa 10 Min. setzte die Ausscheidung von Dicyclohexylharnstoff ein. Man erwärmte das Reaktionsgemisch unter Feuchtigkeitsausschluss 4 Stunden am siedenden Wasserbad, kühlte danach ab, nutschte den Dicyclohexylharnstoff (1,7 g) ab, und wusch ihn am Filter mit eiskaltem Dimethylformamid nach. Das vereinigte Filtrat wurde bei Unterdruck (20 mm; Bad 90°) eingedampft, der zähflüssige Rückstand mit insgesamt 200 ml absol. Äther wiederholt solange digeriert bis er zu einem Pulver zerfiel. Das so gewonnene Produkt (2,4 g) stellt ein Gemisch des amorphen Polyesters (L-Polyester 3) und kristallinen Dicyclohexylharnstoffs (ber. zurückgebliebene Menge 0,8 g) dar. Ausbeute an Polyester etwa 1,6 g (56,3% d.Th.). Da das Harnstoffderivat nicht vollständig entfernt werden konnte, wurde das Mischprodukt unmittelbar zur Herstellung der γ -Poly-L-glutaminsäure herangezogen.

γ -Poly-D-glutaminsäure- α -methylester (IIb). Aus 1,35 g des D-D-Startdipeptids (Ib) wurden auf den oben angegebenen Weg 1,3 g eines pulverartigen Produktes gewonnen, das ein Gemisch des amorphen Polyesters (D-Polyester 3) und kristallinen Dicyclohexylharnstoffs (etwa 0,5 g) darstellt. Ausbeute an Polyester etwa 0,8 g (66,7% d.Th.). Das Produkt wurde unmittelbar zur Herstellung der γ -Poly-D-glutaminsäure herangezogen.

Vierte Methode

γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylester (IIa). Eine mit Eis gekühlte Suspension von 3,22 g (0,01 Mol.) des L-L-Startdipeptids (Ia) in 15 ml absol. Chloroform wurde zuerst mit 1,39 ml (0,01 Mol.) Triäthylamin, dann tropfenweise unter Schütteln mit 1,45 ml (0,01 Mol.) Chlorameisensäurethiophenylester versetzt. Unter gelinder Selbsterwärmung ging ein erheblicher Teil der umgesetzten Substanz sofort in Lösung. Das Gemisch wurde in geschlossenen Gefäß 4 Stunden auf der Maschine geschüttelt, dann das unumgesetzte Startdipeptid (0,55 g) abfiltriert, das Filtrat zweimal mit Wasser, einmal mit verd. Salzsäure, zweimal wiederum mit Wasser ausgeschüttelt, hierauf mit Na₂SO₄ getrocknet und zum Schluss bei Unterdruck und Raumtemperatur eingedampft. Es blieb ein gelbliches, zähflüssiges Öl zurück, das durch wiederholtes Verreiben mit absol. Äther zu einem Pulver zerfiel. Dieses "primäre Umsetzungsprodukt", das 1,3 g wog, konnte nicht kristallisiert werden. Es wurde unmittelbar zum Polyester umgesetzt.

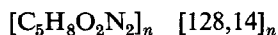
Das "Primäre Umsetzungsprodukt" (1,3 g) wurde in einem Gemisch von 4 ml absol.

Pyridin und 16 ml absol. Benzol gelöst. Schon nach einigen Minuten erschien eine schwache Trübung. Das Gemisch wurde unter Feuchtigkeitsschluss in einem 90° warmen Bad erwärmt, wobei die Substanzabscheidung fortschritt und die Hauptmenge des Produktes sich filmartig an die Kolbenwand ansetzte; die Lösung bekam eine schmutziggelbe Farbe. Nach etwa 60 Stunden war die Ausscheidung des Produktes praktisch beendet. Die Substanz wurde in der Zentrifuge abgetrennt, dann mehrere Mal mit absol. Aceton und hierauf mit absol. Äther gewaschen, schliesslich im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Der so gewonnene Polyester (L-Polyester 4) stellt ein schwach sandfarbiges, amorphes Pulver dar. Ausbeute 610 mg (25,7% d.Th. auf das L-L-Startdipeptid berechnet, abgerechnet den nicht umgesetzten Anteil). Zur Analyse wurde eine Probe in Methanol gelöst, mit Äther ausgefällt, abgeschleudert, dann in der Vakuumpisole über P₂O₅ zuerst bei Raumtemperatur und schliesslich bei 78° getrocknet.



Ber.	C	50,4,	H	6,3,	N	9,8,	CH ₃ O	21,7
Gef.	C	49,5,	H	6,1,	N	9,9,	CH ₃ O	21,0

Konstitutionsermittelnder Abbau des γ -Poly-L-glutaminsäure- α -methylesters. 100 mg des nach der zweiten Methode gewonnenen Polyesters (L-Polyester 2) wurden mit 10 ml flüssigem Ammoniak im Bombenrohr 72 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dessen ging die Substanz fast ganz in Lösung. Nachdem sich das Ammoniak aus dem geöffneten Rohr verflüchtigt hatte, wurde der feste Rückstand im Zentrifugenrohr zweimal mit je 50 ml Wasser, dann zweimal mit je 50 ml eines gleichteiligen Gemisches von Alkohol und Äther, und schliesslich dreimal mit je 30 ml absol. Äther gewaschen. Das an der Luft, danach im Vakuumexsiccator über P₂O₅ getrocknete, weisse, amorphe Polyamid (IIa; R = NH₂ anstatt OCH₃) wog 62 mg (69,3% d.Th.). Zur Analyse wurde eine kleine Probe noch 5 Stunden in der Pistole über P₂O₅ bei 80° getrocknet.



Ber.	N	21,8
Gef.	N	20,6

Es sei erwähnt dass das Polyamid, das aus dem SPP über den Methylester auf dieselbe Weise hergestellt worden ist, genau denselben Stickstoffgehalt (20,6%) aufwies.³²

50 mg des Polyamids wurden mit 0,98 ml einer 2,68 proz. alkalischen Natriumhypochloritlösung unter häufigem Umschwenken zuerst 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann 15 Min. bei 60° behandelt, wobei die Substanz fast ganz in Lösung ging. Nach Zusatz von 10 ml 6 *n*-Salzsäure wurde die Lösung 30 Min. rückfliessend gekocht und dann bei Unterdruck trocken gedampft. Der Rückstand wurde noch zweimal in je 2 ml Wasser gelöst und die Lösung bei Unterdruck eingedampft. Den so gewonnenen Rückstand versetzte man mit 1 ml einer frisch bereiteten, bei Raumtemperatur gesättigten Lösung von *p*-Nitrophenylhydrazin in *n*-Salzsäure, tauchte das Gemisch einige Sek. in ein 70° warmes Bad und liess es danach 15 Min. unter Eiskühlung stehen. Das kristallin ausgeschiedene β -Formylpropionsäure-*p*-nitrophenylhydrazon wurde abgenutscht, auf dem Filter zweimal mit je 1 ml eiskaltem

³² V. Bruckner, J. Kovács und H. Nagy *J. Chem. Soc.* 148 (1953).

Wasser gewaschen und schliesslich im Vakuumexsiccator getrocknet. Es wog 20 mg und schmolz bei 172°. Nach einmaligem Umkristallisieren aus 1 ml Wasser wurde ein analysenreines Produkt gewonnen, das übereinstimmend mit der Literaturangabe³³ bei 177° schmolz und in der Mischprobe mit einem authentischen Präparat vom Schmp. 177° keine Depression zeigte.

30 mg des Polyamids wurden auf oben angegebene Art mit Natriumhypochlorit behandelt, dann die Lösung mit Wasser auf 4 ml verdünnt. Die eine Hälfte dieser Lösung wurde unmittelbar, die andere (Kontrollversuch) nach Zusatz von 0,7 mg $\alpha\gamma$ -Diaminobuttersäure zum Nachweis der für die α -Glutamylbindung charakteristischen^{8, 10} $\alpha\gamma$ -Diaminobuttersäure herangezogen. Man versetzte jede Lösung mit 2 ml rauchender Salzsäure und kochte sie danach 2 Stunden rückfliessend. Die abgekühlte Lösung wurde—zwecks Entfernung der β -Formylpropionsäure—24 Stunden im Apparat mit Äther ausgezogen, dann bei Unterdruck trocken gedampft, der Rückstand mit 5 ml eiskalter, rauchender Salzsäure versetzt, das ausgeschiedene NaCl abfiltriert und das Filtrat bei Unterdruck trocken gedampft. Diese Behandlung des Rückstandes mit rauchender Salzsäure wurde so lange wiederholt, bis eine Ausscheidung von NaCl nicht mehr erfolgte. Die zum Schluss gewonnenen Rückstände der beiden Proben wurden in je 1 ml Wasser gelöst und je 0,01 ml dieser Lösungen der Papierchromatographie unterworfen. (Aufsteigende Chromatographie auf Wh. No. 4 Papier; Lösungsmittel *n*-Butanol–Eisessig–Wasser 4 : 1 : 5; Entwicklung mit Ninhydrin.) Während im Kontrollversuch ausser dem Fleck der Glutaminsäure auch der Fleck der $\alpha\gamma$ -Diaminobuttersäure ganz deutlich erscheint, fehlt der letztere beim originalen Ansatz.

Herstellung der γ -Poly-glutaminsäuren (III) verschiedener Konfiguration aus den entsprechenden Polyestern

Ansätze von 100–1600 mg der verschiedenen Polyester wurden mit einem 50–100-proz. Überschuss von 0,25 *n*-NaOH 1 Stunden am Dampfbad erhitzt, die Lösung nötigenfalles (z.B. bei der Verarbeitung des nach der vierten Methode gewonnenen Polyesters zwecks Entfernung des unlöslich gebliebenen Dicyclohexylharnstoffs) abfiltriert, dann bei p_H 6 (Einstellung mit Salzsäure, bzw. mit Natronlauge) mit einer gesättigten Kupfer(II)sulfat-Lösung das Kupfersalz der Polysäure ausgefällt. Letzteres wurde abgeschleudert und in der Zentrifuge 3–4-mal mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Man löste den feuchten Niederschlag in der eben zureichenden Menge von 0,1 *n*-HCl auf; diese Menge betrug der Regel nach 1 ml je 10–15 mg des angesetzten Polyesters. Diese Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff gesättigt, dann der Überschuss des letzteren mit einem Luftstrom entfernt, der Niederschlag abgeschleudert, in der Zentrifuge 2-mal mit wenig Wasser gewaschen, die mit dem Waschwasser vereinigte Lösung nötigenfalles klarfiltriert, dann gegen dest. Wasser der Dialyse unterworfen unter Verwendung einer Cellophanmembrane (Dialysierschlauch). Die Dialyse wurde bis zum Verschwinden der Chloridreaktion vorgenommen; die Gesamtmenge des 8–12 mal gewechselten Aussenwassers betrug in der Regel 12–15 ml auf je 1 mg des angesetzten Polyesters. Die zurückgebliebene Lösung wurde i. Vak. (Bad 30°) auf 10–20 ml eingeengt, dann der Gefriertrocknung unterworfen. In kolloidaler Form etwa mitgeschlepptes Kupfer(II)sulfid koaguliert im Laufe der Gefriertrocknung und lässt sich durch Lösen des Rückstandes in Wasser,

³³ C. Harries *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **45**, 2585 (1912).

Abfiltrieren der Lösung und Gefriertrocknung des Filtrats vollkommen entfernen.

Die so gewonnene γ -Poly-glutaminsäuren stellen schneeweisse, flaumartige Produkte dar, die in Wasser sehr leicht löslich sind. Sie zeigen—in Übereinstimmung mit dem APP und SPP—keine Biuretreaktion, ihre Ninhydrinreaktion ist—im Vergleich mit der γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure—nur schwach positiv; während die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion (auf Papier getestet) bei der letzteren Substanz etwa 0,2 γ beträgt, liegt sie bei den synthetischen γ -Poly-glutaminsäuren bei etwa 10 γ , stieg jedoch fallweise bis 20 γ an. Beim SPP ursprünglicher Darstellungsart¹ liegt die Empfindlichkeitsgrenze zu mindest bei 25 γ . In Tabelle 1 sind einige Versuchsdaten zusammengefasst; hierzu ist zu bemerken, dass die Ausbeuten nicht auf den angesetzten

TABELLE 1

Hergestelltes Produkt	Angesetzter Polyester		Gewonnene γ -Poly-Glu.		
	Herstellungsart	Menge (mg)	Menge (mg)	H ₂ N-N (%)	Ausbeute (%)
(1) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 1-a	176	48		1,1
(2) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 1-b	688	89	1,18	7,1
(3) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 1-b'	762	138	0,61	9,8
(4) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 2	100	44	1,50	3,9
(5) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 3	~1600	142	0,49	6,3
(6) γ -Poly-L-Glu.	L-Polyester 4	252	73	0,32	7,8
(7) γ -Poly-D-Glu.	D-Polyester 2	138	86	1,50 (0,82)*	5,4 (4,4)*
(8) γ -Poly-D-Glu.	D-Polyester 3	~900	60	0,16	6,3
(9) mesoide- γ -Poly-Glu.	L-D-Polyester 2	220	70	3,6 (2,9)†	1,3

* Produkt (7) wiederholt dialysiert.

† Produkt (9) wiederholt dialysiert.

Polyester, sondern auf das entsprechende Startdipeptid berechnet wurden, und zwar auch dann, wenn der Polykondensation nicht unmittelbar das Startdipeptid, sondern sein Derivat herangezogen wurde.

All die in Tabelle 1 angeführten γ -Poly-glutaminsäuren weisen eine erhebliche Polydispersität auf. Dies liess sich nicht nur bei den serologisch aktiven Polysäuren an Hand der Testungsmethode nach Ouchterlony³¹ zeigen (s. die nachstehende Mitteilung von Ivánovics), sondern bei sämtlichen Produkten auch durch ihre chromatographische Untersuchung. Bei der aufsteigenden Chromatographie (Lösungsmittel Phenol-Wasser 7:3, Entwicklung mit Ninhydrin) wurden von der Auftragstelle ausgehende, in der Wanderungsrichtung verzogene Streifen gewonnen. Durch weitere fraktionierte Dialyse dieser Produkte dialysierten Fraktionen heraus, deren Chromatogramme bei konstanter Laufzeit (20 Stunden) immer kürzere (von der Auftragstelle ausgehende) Streifen darstellten, bis schliesslich das Chromatogramm des undialysierten Rückstandes aus einem einzigen, auf der Auftragstelle verbliebenen scharf abgegrenzten Fleck bestand.

Die synthetischen γ -Poly-glutaminsäuren binden Wasser und Aschebestandteile sehr hartnäckig, ebenso wie dies beim APP und SPP der Fall ist. Dies hat zwei

Folgen: erstens lassen sich vollkommen aschefreie Präparate durch Reinigung mittels einer gewöhnlichen Dialyse kaum gewinnen, und zweitens lässt sich das gebundene Wasser durch Trocknung in der Hochvakuum pistole praktisch genügend schnell nur bei 110–120° entfernen, doch erfolgt bei dieser Temperatur schon eine geringfügige Zersetzung, die auch an der schwachen Verfärbung der schneeweissen Produkte zu erkennen ist. Der Aschegehalt unserer Präparate schwankte zwischen <0,01 und 1,8%. Wegen der grossen Wasserbindungsfähigkeit ist zwar eine strenge Kontrolle der Endprodukte mittels Elementaranalyse nicht möglich, doch liess sich feststellen, dass die bei der Gefrierdrying anfallenden Produkte nach 24 stündigem Aufbewahren im Vakuumexsiccator über P₂O₅ ziemlich genau 1 Mol. gebundenes Wasser je zwei Glutaminsäurereste enthalten. Tabelle 2 fasst einige Daten der Elementaranalyse zusammen; die Trocknungsart ist in der letzten Spalte verzeichnet.

Es ist hier zu bemerken, dass Waley¹⁴ für seine synthetische γ -Poly-L-glutaminsäure, die ebenfalls durch Gefrierdrying herausgewonnen wurde, Analysendaten angibt (C 40,9; H 5,9; N 9,55), die für 1 Mol. gebundenes Wasser je ein Glutaminsäurerest (Ber. C 40,8; H 6,2; N 9,5) entsprechen. Eine derartige Zusammensetzung wurde von uns weder beim SPP oder APP, noch bei unseren synthetischen Produkten beobachtet, hingegen wurde dieser Fall bei der synthetischen $\alpha\gamma$ -Poly-glutaminsäure¹⁰ gefunden. Es ist noch zu bemerken, dass der eine unvollständige Verseifung des Polyesters andeutende geringe Methoxylgehalt einiger Präparate nicht einen unüberwindbaren Fehler der Synthese bedeutet. Wegen den geringen Ansätzen, auf die wir einstweilen angewiesen waren, haben wir—um etwaige Spaltungen der Peptidkette zu vermeiden—die möglichst mildeste Verseifungsart angewandt.

TABELLE 2

Produkt	Herstellungsart S. Tab. 1 No.	C %	H %	N %	CH ₃ O %	Asche (Sulfat) %	Trocknungsart, über P ₂ O ₅ 22 mm
γ -Poly-L-Glu.	2	42,8	5,4				24 Stunden 20°
γ -Poly-L-Glu.	4	44,8	5,7	10,2	0,0	0,0	24 Stunden 20° dann 5 Stunden 110°
γ -Poly-L-Glu.	5	44,2	6,2	10,2	1,5	2,2	24 Stunden 20° dann 1 Stunde 100°
γ -Poly-L-Glu.	6	43,8	6,2		1,0	1,2	8 Stunden 100°
γ -Poly-D-Glu.	7			10,4			24 Stunden 20°
γ -Poly-D-Glu.	8	43,7	6,1	10,3	1,2	0,0	24 Stunden 20°
Subtilis-Polypeptid		43,8	5,5	10,1		0,0	24 Stunden 20°
Ber. (C ₁₀ H ₁₄ O ₆ N ₂ · H ₂ O) _n		43,6	5,85	10,2			
Ber. (C ₅ H ₇ O ₃ N) _n		46,5	5,5	10,8			

Der Ungarischen Akademie der Wissenschaften wird auch an dieser Stelle für die Unterstützung dieser Arbeit gedankt. Die Mikroanalysen wurden in unserem Institut von Fr. H. Schweiger, Fr. S. Kutassy und Fr. J. Kajtár durchgeführt; Herr J. Gera hat uns bei der Durchführung vieler Versuche sehr gute technische Hilfe geleistet. Allen unseren Mitarbeitern gebührt unser bester Dank.