

ERICH WÜNSCH und ANTON ZWICK

Zur Synthese des Glucagons, I

Darstellung der Sequenz 1—4

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
Abtlg. für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 3. April 1964)

Die Synthese von tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycin der N-geschützten Teilsequenz 1—4 des Glucagons wird beschrieben.

Das Pankreashormon Glucagon, ein Peptid mit 29 Aminosäureresten, wurde von BROMER und Mitarbb.¹⁾ in seiner Sequenz aufgeklärt. Es zeichnet sich besonders durch den hohen Gehalt an Hydroxyaminosäuren, das Auftreten von drei β -freien Asparaginsäureresten, ein Arginyl-arginyl-Mittelstück und aminoendständiges Histidin aus. Da darüber hinaus neben fast allen anderen Aminosäuren noch Methionin, Asparagin und Tryptophan vorkommen und racemisierungsfreie Verknüpfungsstellen praktisch wegfallen (keine Prolyl- und nur eine Glycyl-Sequenz in der ungünstigen Stellung 4), sollte der Versuch einer Synthese des Glucagons einen günstigen Prüfstein für die Brauchbarkeit des gegenwärtigen Standes der Peptidchemie ergeben.

Basierend auf unseren früheren Arbeiten über Hydroxyaminosäure-benzyläther²⁾ und Asparaginsäure- β -tert.-butylester³⁾ haben wir fünf Tetra- und drei Tripeptide der Sequenz des Naturstoffs in „verknüpfungsfähigem“ Zustand hergestellt, über die in dieser und den folgenden Arbeiten berichtet werden soll.

TEILSEQUENZ 1—4:

TERT.-BUTYLOXYCARBONYL-L-HISTIDYL-L-SERYL-L-GLUTAMINYL-GLYCIN

Zur Synthese dieses Bruchstücks wurde Z-Glutamin⁴⁾ [3]^{*)} mit Glycin-[*p*-nitrobenzylester] [4b]⁵⁾ am günstigsten nach der Methode der gemischten Anhydride zum Z-Glu(NH₂)-Gly-ONB [3-4a] verknüpft; Bromwasserstoffsolvolyse in Eisessig erbrachte glatt den gewünschten Glutaminyl-glycin-nitrobenzylester [3-4b] (als Hydrobromid kristallisiert erhalten).

Ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Darstellung der Tripeptidstufe bot sich mit dem BOC-*O*-Benzyl-L-serin [2b] an, das wir aus *O*-Benzyl-L-serin [2a]²⁾ nach der

*) Die Ziffern in eckigen Klammern dienen zur Kennzeichnung der Stellung in der Peptidsequenz wie auch zur Bezifferung der Verbindung. Die Derivate einer Aminosäure oder eines Peptids werden mit a, b, c usw. abgezählt (s. Formelschema).

1) W. W. BROMER und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. **79**, 2798, 2805, 2807 [1957].

2) W. GRASSMANN, E. WÜNSCH, P. DEUFEL und A. ZWICK, Chem. Ber. **91**, 538 [1958]; E. WÜNSCH, G. FRIES und A. ZWICK, ebenda **91**, 542 [1958]; E. WÜNSCH und G. FÜRST, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **329**, 109 [1962].

3) E. WÜNSCH und A. ZWICK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **328**, 235 [1962]; **333**, 108 [1963].

4) M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

5) H. SCHWARZ und K. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5691 [1959].

Die Behandlung von [2-4a] mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur lieferte das gewünschte *O*-BZL-Ser-Glu(NH₂)-Gly-ONB [2-4b], kristallisiert erhalten in Form des Trifluoracetats.

Der Anbau des Histidins hatte im Hinblick auf das Endziel einer Totalsynthese des Glucagons nun in einer *N*-geschützten Form zu erfolgen, die über den Gesamtverlauf der Synthese erhalten und in letzter Stufe leicht und ohne Schädigung der Sequenz (Methionin usw.) wieder abgespalten werden kann.

Wir haben daher His-OCH₃·2 HCl [1 a]⁸⁾ mit zwei Äquivalenten BOC-Azid in Pyridin zum Mono-BOC-His-OCH₃ [1 b] umgesetzt und dieses mit Hydrazinhydrat in Methanol in kristallisiertes Mono-BOC-His-NHNH₂ [1 c] übergeführt (Gesamtausbe. 74.5%, bez. auf His-OCH₃·2 HCl). Die Verbindung wurde inzwischen auch von E. SCHRÖDER und H. GIBIAN⁹⁾ beschrieben. Die Reaktion von freiem His-OCH₃ mit BOC-Azid im großen Überschuß (zugleich Lösungsmittel) erbrachte ein Gemisch von Mono- und Bis-BOC-His-OCH₃, das sich durch fraktionierte Kristallisation weitgehend auftrennen ließ. Beide Acylester ergaben nach Hydrazinolyse reines BOC-His-NHNH₂ [1 c]; dieser Weg erbrachte jedoch keine Ausbeutesteigerung, auch wenn das BOC-Estergemisch direkt der Umsetzung unterworfen wurde.

Nach dem von RUDINGER und Mitarb.¹⁰⁾ modifizierten Azid-Verfahren wurde nunmehr die His-Komponente [1 c] mit *O*-BZL-Ser-Glu(NH₂)-Gly-ONB [2-4 b] zum BOC-His-*O*-BZL-Ser-Glu(NH₂)-Gly-ONB [1-4a] verknüpft, das in amorpher Form in ca. 69-proz. Ausbeute anfiel.

Die hydrogenolytische Spaltung der Nitrobenzylester- und Benzyläther-Gruppe in [1-4a] ergab chromatographisch reines BOC-His-Ser-Glu(NH₂)-Gly [1-4 b] als farbloses Pulver in 74-proz. Ausbeute.

Dieses *N*-geschützte Tetrapeptid [1-4 b] stellt eine geeignete Komponente dar zur Verknüpfung mit dem Tetrapeptid Thr-Phe-Thr-*O*-BZL-Ser-NHNH₂-Z (Glucagon-Sequenz 5–8), über dessen Synthese in der folgenden Arbeit berichtet wird.

Den FARBWERKEN HOECHST AG und den FARBENFABRIKEN BAYER AG sind wir für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung der vorliegenden und folgenden Arbeiten über Glucagon-Sequenzen zu hohem Dank verpflichtet. Herrn A. VOLK (Farbwerke Hoechst AG, Pharmaforschung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. SIEDEL) danken wir für seine ausgezeichnete technische Mitarbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. TOTTOLI bestimmt und die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet.

1. *Benzoyloxycarbonyl-glycin-[p-nitro-benzylester]* [4a]: 125.0 g (600 mMol) *Z*-Glycin werden zusammen mit 154.5 g (900 mMol) *p*-Nitro-benzylchlorid und 126 ccm (900 mMol) Tri-*ä*thylamin in 1000 ccm Essigester 14 Std. unter Rühren und Rückfluß erwärmt. Danach wird noch heiß filtriert, das Filtrat mit 50 ccm Aceton versetzt und nacheinander mit Wasser, verd. Salzsäure, Wasser, KHCO₃-Lösung und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak.

⁸⁾ Nach G. HILLMANN, Z. Naturforsch. 1, 682 [1946].

⁹⁾ Liebigs Ann. Chem. 656, 190 [1962].

¹⁰⁾ J. HONZL und J. RUDINGER, Collect. czechoslov. chem. Commun. 26, 2333 [1961].

eingengt. Der Ester (187.5 g) fällt nach Zugabe von Ligroin, Schmp. 106–108°. Aus Essigester/Ligroin oder Äthanol Plättchen vom Schmp. 108–108.5° (Lit.⁵): 107–109.5°, Ausb. 186.2 g (90% d. Th.).

2. *Glycin-[p-nitro-benzylester]-hydrobromid* ([4b]·HBr): Zu einer Lösung von 243.0 g (706 mMol) *Z-Glycin-[p-nitro-benzylester]* [4a] in 300 ccm Essigester und 300 ccm Eisessig werden unter Kühlung 226 g HBr, gelöst in 400 ccm Eisessig, gegeben. Bereits nach 5 Min. scheiden sich Kristalle ab. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wird die Fällung mit Äther vervollständigt, 1 Stde. in der Kälte belassen und abgesaugt. Nach Trocknen über KOH im Exsikkator wird aus Methanol/Essigester umkristallisiert. Plättchen vom Schmp. 194.5–197° (Lit.⁵): 196–202°, Ausb. 183.5 g (89% d. Th.).

3. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutamin* [3]: 98.9 g (678 mMol) *L-Glutamin* werden bei 60° in 110 ccm 1.5*N* NaHCO₃ gelöst und unter gutem Rühren bei 20° innerhalb von 2 Stdn. mit 102 ccm (710 mMol) *Chlorameisensäure-benzylester* acyliert. Nach weiteren 30 Min. wird die Lösung 3 mal mit Äther extrahiert und schließlich mit konz. Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Nach 1 stdg. Stehenlassen in der Kälte wird der Niederschlag abgesaugt; aus wenig Wasser Nadeln vom Schmp. 138–139.5°. $[\alpha]_D^{20}$: -7.1°, $[\alpha]_{546}^{20}$: -8.8° (*c* = 2, in Äthanol); $[\alpha]_D^{20}$: -1.7°, $[\alpha]_{546}^{20}$: -2.3° (*c* = 2, in Eisessig) [Lit.⁴): Schmp. 137°, $[\alpha]_D^{25}$: -1.5° (*c* = 4, in Eisessig). Ausb. 147.8 g (78% d. Th.).

4. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminy-glycin-[p-nitro-benzylester]* [3-4a]: 56.0 g *Z-L-Glutamin* [3] (200 mMol) und 27.8 ccm Triäthylamin in 400 ccm Tetrahydrofuran werden bei -10° unter Rühren mit 19.1 ccm (200 mMol) *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach 15 Min. bei -10° wird eine Lösung von 58.4 g (200 mMol) *Glycin-[p-nitro-benzylester]-hydrobromid* ([4b]·HBr) und 27.8 ccm Triäthylamin in Tetrahydrofuran zugegeben; kurze Zeit später kristallisiert der *Benzoyloxycarbonyl-dipeptidester* aus. Nach 2 stdg. Rühren bei 0° und weiteren 2 Stdn. bei Raumtemperatur filtriert man und engt das Filtrat i. Vak. zur Trockne ein. Die vereinigten Rückstände, digeriert mit 1000 ccm sehr verd. Salzsäure, werden gut abgesaugt und gewaschen. Aus 80-proz. Äthanol Nadeln, Schmp. 200.5–201°, $[\alpha]_D^{20}$: -9.5 ± 0.5°, $[\alpha]_{546}^{20}$: -11.54° (*c* = 2, in 80-proz. Essigsäure). *R_F* 0.9 mit Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5). Ausb. 78.8 g (83.5% d. Th.).

C₂₂H₂₄N₄O₈ (972.5) Ber. C 55.83 H 5.12 N 11.86 Gef. C 56.01 H 5.0 N 12.12

5. *L-Glutaminy-glycin-[p-nitro-benzylester]-hydrobromid* ([3-4b]·HBr): 184.9 g (392 mMol) *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminy-glycin-[p-nitro-benzylester]* [3-4a], in 180 ccm Eisessig suspendiert, werden unter Kühlung mit 96 g Bromwasserstoff in Eisessig (1.2 Mol) versetzt; Lösung erfolgt nach ca. 5 Min. Nach 45 Min. beginnt das *Dipeptidesterhydrobromid* auszufallen. Der überschüss. Bromwasserstoff wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit viel absol. Äther versetzt. Man dekantiert und schüttelt mit Äther und absol. Essigester, wobei Kristallisation erfolgt. Nach mehrstdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird abfiltriert und über P₂O₅/KOH scharf getrocknet. Aus Methanol Nadeln, Schmp. 173–174°, $[\alpha]_D^{20}$: +15.5 ± 0.5°, $[\alpha]_{546}^{20}$: +17.8° (*c* = 1, in 80-proz. Essigsäure). *R_F* 0.37 mit Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5). Ausb. 134.0 g (82% d. Th.).

C₁₄H₁₉N₄O₆]Br (419.2) Ber. N 13.37 Gef. N 13.30

6. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serin* [2b]: 78 g *O-Benzyl-serin*, in 100 ccm 4*N* NaOH und 200 ccm Dioxan gelöst, werden mit 80 g BOC-Azid und 4 g Magnesiumoxid versetzt. Unter Rühren wird das Gemisch auf 45° (Badtemp.) erwärmt, wobei langsam Lösung (MgO) eintritt. Nach erneuter Zugabe von 30 g BOC-Azid und 4 g MgO läßt man insgesamt 21 Stdn. bei 45° weiterrühren. Das Filtrat säuert man vorsichtig mit Citronensäure an und nimmt das abgeschiedene Öl in Essigester auf. Die abgetrennte organische Phase wird erschöpfend mit

KHCO₃-Lösung extrahiert, die vereinigten Extrakte werden mit Citronensäure angesäuert und das so gereinigte *BOC-O-Benzyl-serin* wird in Äther aufgenommen. Die über Na₂SO₄ getrocknete Lösung engt man i. Vak. weitgehend ein und behandelt den Rückstand mit Petroläther, wobei Kristallisation eintritt. Aus Äther/Petroläther Schmp. 60–62°, $[\alpha]_{D}^{20}$: +20.4 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{D}^{20}$: +24.2° (*c* = 2, in 80-proz. Äthanol). Ausb. 102.3–106.6 g (92 bis 94 % d. Th.).

C₁₅H₂₁NO₅ (295.3) Ber. C 61.0 H 7.17 N 4.74 Gef. C 60.94 H 7.43 N 4.86

Aus der ersten citronensauren, wäbr. Lösung läßt sich nichtumgesetztes *O-Benzyl-serin* nach Neutralisieren mit Ammoniak und Einengen der Lösung i. Vak. auf ein kleineres Vol. zurückgewinnen.

7. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]* [2-4 a]

a) 20.65 g (70.0 mMol) *BOC-O-Benzyl-L-serin* [2b] werden in 100 ccm Tetrahydrofuran und 9.5 ccm *Triäthylamin* gelöst und dazu 6.7 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* bei –10° getropft. Nach 10 Min. bei –10° wird eine Lösung von 29.4 g (70.0 mMol) *Glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]-hydrobromid* ([3-4b]·HBr) und 9.5 ccm *Triäthylamin* in Dimethylformamid/Chloroform (6:4) zugegeben und 4 Stdn. bei –10° sowie weitere 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach 12 Stdn. bei Raumtemp. engt man die Lösung i. Vak. ein, versetzt mit Wasser und läßt im Kühlschrank kristallisieren. Der abgesaugte Niederschlag wird in warmem Essigester aufgenommen, die Lösung wie üblich gewaschen (Citronensäure und KHCO₃-Lösung), getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft. Aus Äthanol/H₂O (2:3) Schmp. 146.5–147.5°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –11.7 ± 0.5°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –14.5° (*c* = 2, in Methanol). *R_F* 0.38 mit *n*-Heptan/Butanol/Pyridin (2:2:1), *R_F* 0.77 mit *n*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 39.3 g (91.5% d. Th.).

C₂₉H₃₇N₅O₁₀ (615.7) Ber. C 56.58 H 6.06 N 11.38 Gef. C 56.58 H 5.91 N 11.62

b) 2.85 g (10.0 mMol) *BOC-O-Benzyl-L-serin* [2b] und 1.39 ccm *Triäthylamin* in Acetonitril werden mit einer Lösung von 4.19 g (10.0 mMol) *Glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]-hydrobromid* ([3-4b]·HBr) in Dimethylformamid bei 0° vereinigt und auf –10° abgekühlt. Danach gibt man 2.06 g *Dicyclohexylcarbodiimid* hinzu und rührt 4 Stdn. bei –10° und weitere 20 Stdn. bei 0°. Schließlich wird vom Harnstoff abfiltriert, die Lösung i. Vak. eingengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, wie unter a) gewaschen und aufgearbeitet. Aus Äthanol/Wasser Nadeln vom Schmp. (140°) 144–146°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –8.7°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –10.1° (*c* = 1, in Methanol). Nach fraktionierter Kristallisation aus Äthanol/Wasser, wobei zuerst Dicyclohexylharnstoff ausfällt, Nadeln vom Schmp. 147–148°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –11.4°, $[\alpha]_{D}^{20}$: –14.3° (*c* = 1, in Methanol). Ausb. 4.8 g (78% d. Th.).

8. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycin* [2-4 c]: 9.22 g (15.0 mMol) *BOC-O-Benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]* [2-4 a], gelöst in 150 ccm Dioxan, werden mit 15.01 ccm *n* NaOH bei pH 10.5–11 verseift. Nach Zugabe von 14.5 ccm *n* HCl zieht man das Dioxan i. Vak. ab, versetzt mit 10-proz. Citronensäurelösung und läßt in der Kälte kristallisieren. Man saugt ab, wäscht mehrmals mit eiskaltem Wasser und trocknet im Exsikkator über P₂O₅. Durch Behandeln des Rohprodukts mit warmem Äther wird vom *p*-Nitro-benzylalkohol abgetrennt (2.29 g, Schmp. 79–80°) und der Rückstand aus Methanol/Äther umkristallisiert. Schmp. 156–158°, Ausb. 7.0 g (97% d. Th.).

C₂₂H₃₂N₄O₈ (480.5) Ber. C 54.99 H 6.71 N 11.66 Gef. C 54.33 H 6.79 N 11.81

9. *O-Benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]-trifluoacetat* ([2-4b]·CF₃CO₂H): Zu 45 ccm gekühlter *Trifluoressigsäure* gibt man unter Rühren 36.4 g (59.2 mMol) *BOC-Tripeptidester* [2-4 a]. Nach ca. 20 Min. tritt vollständige Lösung ein. Man rührt

noch 40 Min. bei Raumtemp., zieht dann die überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. (25° Badtemp.) ab und behandelt den Rückstand mit absol. Äther. Nach mehrstdg. Stehenlassen in der Kälte wird abgesaugt und i. Vak. über KOH und P₂O₅ getrocknet. Aus Äthanol/Äther Schmp. 85–89° (Erweichen bei 82°). $[\alpha]_D^{20}$: $-11.0 \pm 0.5^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20}$: -13.2° ($c = 2$, in Methanol); R_F 0.77 mit n-Amylalkohol/Pyridin/H₂O (35 : 35 : 30); Ausb. 35.4 g (93.5% d. Th.).

C₂₄H₃₀N₅O₈]CF₃CO₂ (629.6) Ber. C 49.61 H 4.80 N 11.13 Gef. C 49.62 H 4.94 N 11.20

10. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidin-hydrasid [1c]*: Die Suspension von 121.0 g (500 mMol) *L-Histidin-methylester · 2HCl* in 500 ccm Chloroform wird auf 0° abgekühlt und unter Rühren mit *Ammoniak*/Chloroform versetzt. Nach ca. 30 Min. wird vom umgesetzten Ammoniumchlorid abfiltriert, das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der ölige Rückstand mit 200 ccm Pyridin und 143 g (1.00 Mol) *BOC-Azid* versetzt. Nach 84 Stdn. bei Raumtemp. wird die Lösung i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Äther/Petroläther (1 : 2) versetzt und in der Kälte der Kristallisation überlassen. Aus Essigester/Äther bzw. Essigester/Petroläther (die zunächst ausfallenden braunen Schmierer werden abfiltriert) erhält man nahezu reinen *Mono-BOC-histidin-methylester* [1b]. Ausb.: 1. Frakt. 50.1 g, Schmp. 121.5–123°, 2. Frakt. 82.7 g, Schmp. 117–120°. Eine kleine Probe wurde zur Analyse aus Essigester umkristallisiert. Schmp. 124–125°, $[\alpha]_D^{20}$: -13.6° , $[\alpha]_{546}^{20}$: -15.8° ($c = 2$, in Pyridin).

132.8 g *BOC-Histidin-methylester* (1. und 2. Fraktion) werden in 400 ccm Methanol gelöst und mit 59 ccm *Hydrazinhydrat* über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Danach wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der ölige Rückstand im Exsikkator mehrere Tage über konz. Schwefelsäure aufbewahrt. Schließlich wird das harzige Produkt mit Essigester 20 Min. unter Rückfluß erwärmt, wobei Kristallisation eintritt. Man reinigt das *Hydrazid* durch dreimaliges Auskochen mit heißem Essigester. Schmp. 142.5–144.5° (Zers.), Ausb. 100 g (74.5%, bez. auf *Histidin-methylester · 2HCl*). Zur Analyse wurde eine kleine Probe aus viel Essigester umkristallisiert: Schmp. 145–146°, $[\alpha]_D^{20}$: -24.5° , $[\alpha]_{546}^{20}$: -29.8° ($c = 1.2$, in Pyridin). R_F 0.59 mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2).

C₁₁H₁₉N₅O₃ (269.3) Ber. C 49.06 H 7.11 N 26.01 Gef. C 49.09 H 6.93 N 26.33

11. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester] [1-4a]*: 3.5 g (13 mMol) *BOC-L-Histidin-hydrasid* [1c] in 10 ccm Dimethylformamid werden bei -15° mit 20 ccm 2*n HCl* in Tetrahydrofuran und darauf mit 1.6 ccm *tert.-Butylnitrit* versetzt; nach 10 Min. neutralisiert man mit 5.6 ccm Triäthylamin in 25 ccm Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (1 : 1) und vereinigt mit einer Lösung von 8.2 g *O-Benzyl-serylglutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]-trifluoacetat* ([2-4b]·CF₃CO₂H) und 1.82 ccm *Triäthylamin* in 40 ccm Dimethylformamid. Nach je 12 Stdn. bei 0° bzw. Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase rasch mit Wasser gewaschen und nach Zugabe von Dimethylformamid über Natriumsulfat getrocknet. Der nach Einengen i. Vak. erhaltene Rückstand wird mit Wasser behandelt und über Nacht im Kühlschrank bei +1° aufbewahrt; nach Absaugen und Trocknen bei 0.05 Torr über P₂O₅ Schmp. (140–142°) 144–146°. Ausb. 6.90 g (69% d. Th.).

C₃₅H₄₄N₈O₁₁·H₂O (770.8) Ber. C 54.54 H 6.01 H₂O 2.34 Gef. C 54.1 H 6.1 H₂O 2.2

12. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-seryl-L-glutaminyglycin [1-4b]*: 3.0 g *tert.-Butyloxycarbonyl-histidyl-O-benzyl-seryl-L-glutaminyglycin-[p-nitro-benzylester]-hydrat* ([1-4a]·H₂O) in 200 ccm 50-proz. Methanol werden unter Erwärmen gelöst; nach 1stdg. Stehenlassen wird das Filtrat 10 Stdn. wie üblich in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert (dreimaliger Katalysatorwechsel). Die erhaltene Lösung wird i. Vak. bei Raumtemp. eingedampft und der Rückstand über P₂O₅ bei 0.05 Torr getrocknet (2.35 g). Das farblose Pulver wird mit 50 ccm absol. Äthanol ausgekocht, noch heiß abgesaugt und nach Waschen mit

20 ccm heißem Äthanol über P_2O_5 bei 0.03 Torr getrocknet. Schmp. $166-168^\circ$ (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $-32.7 \pm 0.8^\circ$ ($c = 2$, in Wasser). R_F 0.42 mit n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (30 : 6 : 24 : 20).

Die durch Auskochen mit Äthanol erhaltene Lösung wird nach 48 Stdn. im Kühlschrank von der gebildeten Gallerte abgesaugt, der voluminöse Rückstand mit absol. Äthanol gewaschen und über P_2O_5 bei 0.03 Torr getrocknet. Schmp. unscharf bei ca. 165° , $[\alpha]_D^{25}$: $-32.3 \pm 0.8^\circ$ ($c = 2$, in Wasser), R_F 0.42 mit vorstehendem System. Gesamtausb. 1.60 g (74% d. Th.).

$C_{21}H_{33}N_7O_9 \cdot 1.5H_2O$ (554.6) Ber. C 45.48 H 6.54 N 17.68 H_2O 4.87

Gef. C 45.5 H 6.5 N 17.2 H_2O 4.7

Aminosäure-Analyse: His : Glu : Ser : Gly : NH_3 Ber. 1.0 : 1.0 : 1.0 : 1.0 : 1.0

Gef. 0.99 : 1.08 : 0.90 : 1.0 : 0.88
