

ERICH WÜNSCH und GERHARD WENDLBERGER

Zur Synthese des Glucagons, II^{*)}

Darstellung der Sequenz 5—8

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

(Eingegangen am 3. April 1964)

Die Synthese von L-Threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid, der carboxylgeschützten Glucagon-Teilsequenz 5—8, nach 4 verschiedenen Wegen wird beschrieben.

In der vorstehenden Mitteilung^{*)} haben wir über die Darstellung der *N*-geschützten Glucagon-Teilsequenz 1—4 berichtet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Teilsequenz 5—8 in einer Form aufzubauen, die erstens eine Vereinigung mit BOC-His-Ser-Glu(NH₂)-Gly-OH (Sequenz 1—4)^{*)} zum *N*-geschützten Octapeptid (Sequenz 1—8) ermöglicht und zweitens die Teilsequenz 1—8 in „verknüpfungsbereitem“ Zustand entstehen läßt.

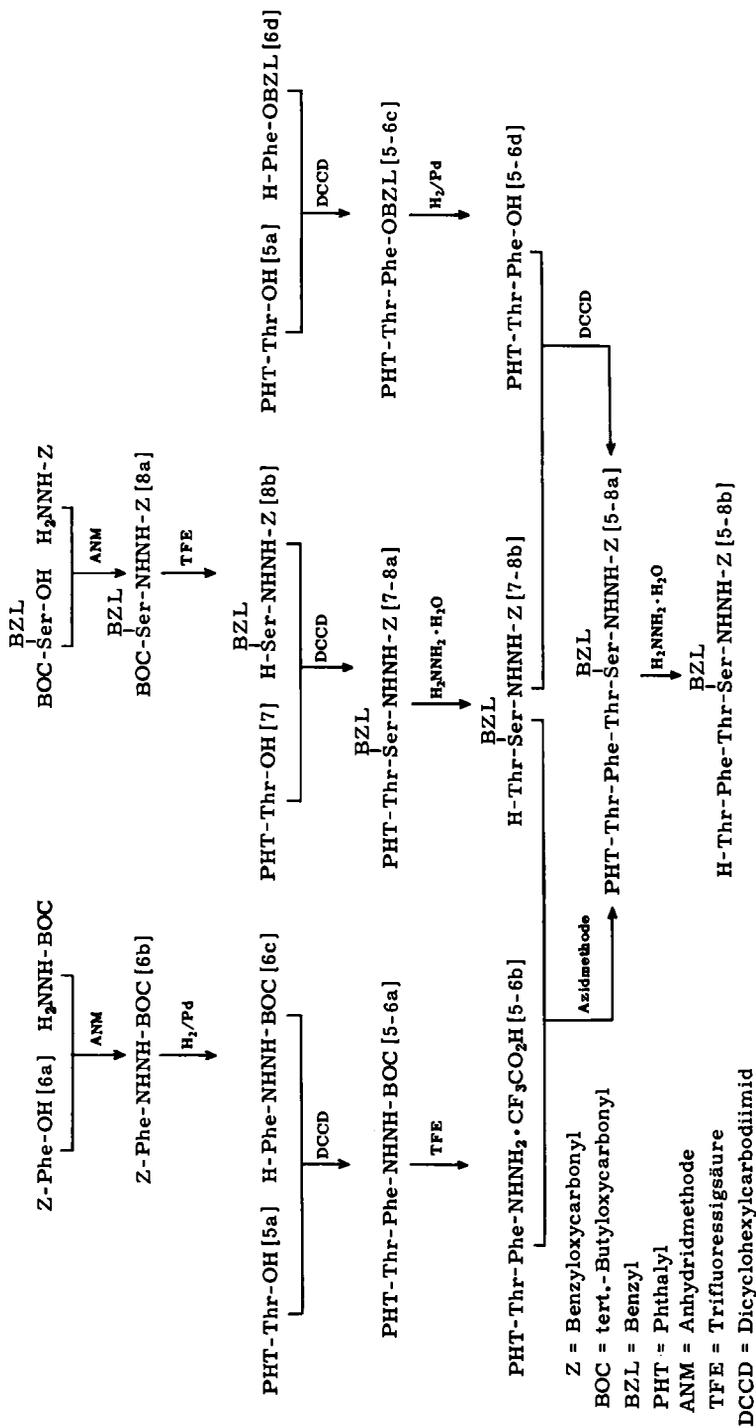
Kernstück dieser Synthese bildete die gute Zugänglichkeit von Threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [7-8b]^{**)}, das aus BOC-O-Benzyl-serin ([2], siehe I. Mittel.) über das BOC-Benzylserin-benzyloxycarbonylhydrazid [8a] und O-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [8b] durch Verknüpfung des letzteren mit Phthalyl-threonin [7] und hydrazinolytische Entacylierung des Phthalyl-threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazids [7-8a] hergestellt wurde.

Mit Hilfe dieses Dipeptid-Derivats [7-8b] gelang der Aufbau der Teilsequenz 5—8 nach vier Alternativwegen, die zugleich die bislang unsichere Erhaltung der *vollen optischen Aktivität* bei den beteiligten Aminosäuren Phenylalanin und Threonin (Stellung 5 und 7) im Hinblick auf die Verknüpfungs- sowie Abspaltungsmethodik zu erbringen hatten. Dies gelang nach dem aufgezeichneten Wege mit Erfolg.

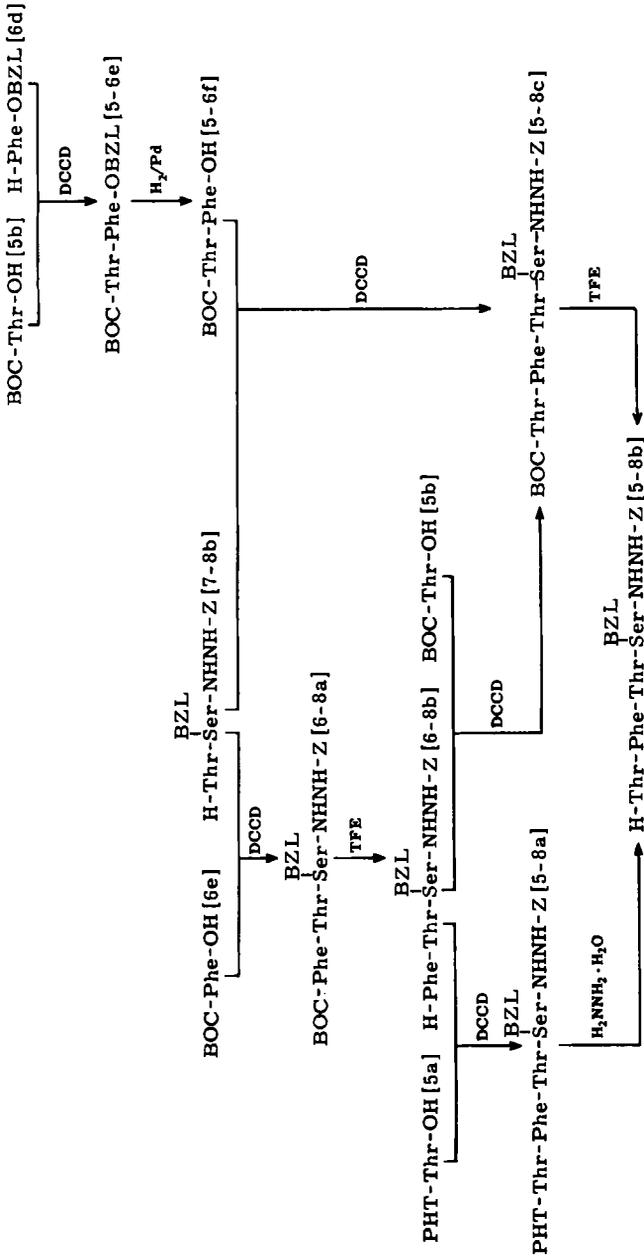
Weg A: Phenylalanin-BOC-hydrazid [6c], nach der Anhydridmethode aus Z-Phenylalanin [6a] und BOC-Hydrazid und nachfolgender Entfernung der Z-Schutzgruppe zugänglich, ließ sich gut mit Phthalyl-threonin [5a bzw. 7] zum Phthalyl-threonyl-phenylalanin-BOC-hydrazid [5-6a] verbinden; Protonen-Solvolyse des BOC-Restes ergab Phthalyl-threonyl-phenylalanin-hydrazid [5-6b], dessen übliche Azid-Verknüpfung mit Threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [7-8b] zum Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8a] führte.

^{*)} I. Mittel.: E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. 97, 2497 [1964], vorstehend.

^{**)} Wie in der vorstehenden Mittel. bezeichnen die Ziffern in eckigen Klammern die Stellung in der Peptidsequenz. Sie dienen gleichzeitig zur Bezifferung einer Verbindung. Die Derivate einer Aminosäure oder eines Peptids werden mit a, b, c usw. abgezählt (s. Reaktionsschemata).



Schema 1. Sequenz 5-8, Weg A und B



Schema 2. Sequenz 5-8, Weg C und D

Weg B: Einfacher sollte eine Carbodiimid-Synthese aus Phthalyl-threonyl-phenylalanin [5-6d] (aus Phthalyl-threonin [5a] und Phenylalanin-benzylester [6d] und nachfolgende hydrogenolytische Benzylester-Spaltung des Phthalyl-dipeptidesters [5-6c] mit hoher Ausbeute zugänglich) und dem Dipeptid-Derivat [7-8b] sein; sie

glückte unter vollem Erhalt der optischen Aktivität des Phenylalanins (soweit es das kristallisierte, in 85-proz. Ausbeute isolierte Tetrapeptid-Derivat betrifft).

Weg C: Eine Racemisierung kann bei „stufenweisem“ Aufbau der Tetrapeptidsequenz unter Verwendung von BOC- bzw. Phthalyl-Aminosäuren praktisch ausgeschlossen werden. Threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [7-8 b] wurde deshalb mit BOC-Phenylalanin [6e] zum BOC-Tripeptid-Derivat [6-8 a] umgesetzt, der BOC-Rest mittels Trifluoressigsäure entfernt und das erhaltene freie Tripeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [6-8 b] mit Phthalyl-threonin [5a] zum Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8 a] verknüpft.

Hydrazinolyse der nach A, B und C synthetisierten, chromatographisch und analytisch identischen Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazide [5-8 a] lieferte wieder identische Tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazide [5-8 b].

Weg D: Der 4. Alternativweg sah den Ersatz von Phthalyl-threonin [5a] durch dessen BOC-Analogue [5b] in der Synthese des Weges B bzw. C vor, d. h. Verknüpfung von BOC-Threonyl-phenylalanin [5-6f] mit Threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [7-8 b] bzw. BOC-Threonin [5b] mit Phenylalanyl-threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [6-8 b] zum BOC-Tetrapeptid-Derivat [5-8 c] und folgende Entacylierung mittels Trifluoressigsäure zum Threonyl-phenylalanyl-threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8 b].

Alle Wege erbrachten in ihren Eigenschaften identische Verbindungen (s. Schema 1 und 2 — Weg A und B bzw. Weg C und D).

Den FARBERWERKEN HOECHST AG und den FARBENFABRIKEN BAYER AG sind wir wiederum zu hohem Dank verpflichtet. — Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND danken wir herzlichst für die Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen zur Klärung der Racemisierungsfrage, Fräulein B. BOUSCHKA und Fräulein U. GRUBER für ihre 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 (Werte der D-Linie berechnet).

1. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [8a]: Zu 29.55 g *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serin* und 13.9 ccm *Triäthylamin* in 200 ccm Tetrahydrofuran läßt man bei -10° unter Rühren 9.6 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* tropfen und gibt nach 10 Min. bei -10° die Lösung von 20.3 ccm *Benzyloxycarbonylhydrazin-hydrochlorid* und 13.9 ccm *Triäthylamin* in 200 ccm Chloroform zu. Es wird 4–5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, über Nacht im Kühlschrank stehengelassen und dann i. Vak. weitgehend vom Lösungsmittel befreit. Man verteilt den Rückstand zwischen Essigester und Wasser, wäscht die Essigesterphase wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt i. Vak. ein. Aus Äther/Petroläther Schmp. $75-77^{\circ}$ ($76.5-78^{\circ}$). Ausb. 40–41.3 g (90.5–93 % d. Th.).

$C_{23}H_{29}N_3O_6$ (443.5) Ber. C 62.29 H 6.59 N 9.48 Gef. C 62.53 H 6.68 N 9.39

2. *O-Benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [8b]: 108.9 g *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [8a] werden mit 250 ccm *Trifluoressigsäure* von 0° übergossen und 15 Min. unter Eiskühlung und dann 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehen-

gelassen (Auflösung und Gasentwicklung). Nach restloser Entfernung überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. verteilt man den Rückstand zwischen eiskalter Kaliumhydrogencarbonatlösung und Äther, wäscht die abgetrennte Ätherphase mit wenig Wasser neutral und trocknet über Natriumsulfat; beim Einengen i. Vak. tritt Kristallisation ein. $[\alpha]_D^{20}$: +8.32 \pm 0.5°, $[\alpha]_{346}^{20}$: +9.56° ($c = 2$, in Methanol). Ausb. 78.8 g (93.5% d. Th.).

$C_{18}H_{21}N_3O_4 \cdot 3/4 H_2O$ (343.4) Ber. C 60.87 H 6.05 N 11.81 Gef. C 60.75 H 6.34 N 11.80

3. *Phthalyl-L-threonin* [5a bzw. 7]: 76.4 g (0.64 Mol) aus Wasser mit viel Äthanol rasch gefälltes und getrocknetes *Threonin* werden mit 114 g (0.77 Mol) *Phthalsäureanhydrid* in 500 ccm Dioxan während 5 Stdn. bei 105° unter Rühren umgesetzt. Nach Abkühlen dampft man i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in heißem Wasser auf und überläßt im Kühlschrank der Kristallisation. Der Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und schließlich mit heißem Chloroform behandelt, wobei Phthalsäure ungelöst zurückbleibt. Die erhaltene Lösung engt man i. Vak. ein und kristallisiert den Rückstand aus wenig Essigester/Petroläther (oder aus Wasser) um. Schmp. 140–143°, $[\alpha]_D^{20}$: -37.4 \pm 0.5°, $[\alpha]_{346}^{20}$: -44.86° ($c = 2$, in Äthanol). Ausb. 81.0 g (51% d. Th.)*.

4. *Phthalyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [7-8a]: 34 g *O-Benzylserin-benzyloxycarbonylhydrazid* [8b] und 24 g *Phthalyl-L-threonin* [5a] in Acetonitril werden bis zur Lösung gerührt, dann werden bei -10° 20 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in Acetonitril zugegeben. Nach 4stdg. Rühren bei -5° läßt man über Nacht im Kühlschrank stehen und rührt 2 Stdn. bis zum Erreichen von Raumtemperatur nach. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Lösung wie üblich mit Kaliumhydrogencarbonatlösung, verd. Schwefelsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Beim Erwärmen und Verreiben des Rückstandes mit Äther tritt Kristallisation ein. Aus Äthanol/Äther/Petroläther Schmp. 132–133.5°. Ausb. 51.5 g (92% d. Th.).

$C_{30}H_{30}N_4O_8$ (574.6) Ber. C 62.71 H 5.26 N 9.75 Gef. C 62.84 H 5.18 N 9.78

5. *L-Threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [7-8b]: Man löst 57.5 g *Phthalyl-Derivat* [7-8a] in 600 ccm Methanol unter Zugabe von 5 ccm 100-proz. *Hydrazinhydrat*, beläßt 20 Stdn. bei Raumtemperatur (Niederschlag) und dampft dann i. Vak. ein. Den Rückstand schüttelt man mit 100 ccm *n* HCl, 150 ccm H_2O und 1 ccm Essigsäure und erwärmt kurze Zeit (ca. 10 Min.) auf 40° (45° Badtemperatur). Nach Abkühlen wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen [Rückstand 15 g Phthalhydrazid, Schmp. >320° (Zers.)]. Zum stark gekühlten Filtrat gibt man 100 ccm eiskaltes *n* NaOH und etwas Natriumhydrogencarbonatlösung bis zur alkalischen Reaktion und extrahiert unter Natriumchlorid-Sättigung mit Essigester. Die vereinigten Essigesterphasen werden rasch mit Wasser gewaschen (beginnende Kristallisation). Nach Abkühlen wird der Niederschlag abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingengt und wie üblich aufgearbeitet. Aus siedendem Essigester Schmp. 114–115°. Ausb. 38.0 g (86% d. Th.).

$C_{22}H_{28}N_4O_6$ (444.5) Ber. C 59.45 H 6.35 N 12.61 Gef. C 59.69 H 6.74 N 12.57

6. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [6b]: Zu 59.9 g *Benzyloxycarbonyl-phenylalanin* in 400 ccm Tetrahydrofuran und 27.9 ccm *Triäthylamin* läßt man bei -10° unter Rühren 19.2 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* zutropfen. Nach 10 Min. werden 26.5 g *BOC-Hydrazin* zugegeben, und der Ansatz wird 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Tetrahydrofurans i. Vak. verteilt man den Rückstand zwischen

*) J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN und G. P. HESS (J. Amer. chem. Soc. 78, 1367 [1956]) geben 92% Ausb. (Schmp. 135–140 bzw. 143–144°) und $[\alpha]_D^{20}$: -36.7° in absol. Äthanol an. Trotz mehrfacher Versuche unter Variation der Bedingungen erhielten wir eine maximale Ausb. von ca. 50%.

Essigester und Wasser, wäscht die abgetrennte Essigester-Phase wie üblich mit Citronensäure- und Kaliumhydrogencarbonatlösung und trocknet über Natriumsulfat. Der nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Rückstand kristallisiert beim Verreiben mit Petroläther. Aus Äther Schmp. 81–84°. Ausb. 66.5–69.5 g (81–84% d. Th.).

$C_{22}H_{27}N_3O_5$ (413.5) Ber. C 63.90 H 6.58 N 10.16 Gef. C 64.06 H 6.81 N 9.88

7. *L*-Phenylalanin-*tert*.-butyloxycarbonylhydrazid [6c]: Von 98 g *Benzylloxycarbonyl-Derivat* [6b] in Methanol wird wie üblich die *Z*-Schutzgruppe hydrogenolytisch abgespalten, das Filtrat i. Vak. eingeengt und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther oder Essigester/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 115–116°, $[\alpha]_D^{20}$: +20.0 ± 0.5°, $[\alpha]_{546}^{20}$: +23.24° (*c* = 1.85, in Äthanol). Ausb. 63 g (95.5% d. Th.).

$C_{14}H_{21}N_3O_3$ (279.3) Ber. C 60.20 H 7.58 N 15.04 Gef. C 60.45 H 7.40 N 14.87

8. *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanin-tert*.-butyloxycarbonylhydrazid [5-6a]: 40 g *Phthalyl-threonin* (0.16 Mol) und 44.8 g *Phenylalanin-tert*.-butyloxycarbonylhydrazid [6c] in Acetonitril versetzt man bei –5° mit 33.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid*, rührt 2 Stdn. bei dieser Temp. und läßt über Nacht bei –5 bis –10° stehen. Unter Zusatz von Dimethylformamid wird 2 Stdn. bis Erreichen der Raumtemperatur gerührt (dabei erfolgt teilweise Lösung), auf 0° abgekühlt und der Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wird in wenig Essigester heiß gelöst; auf Zusatz von Äther tritt alsbald Kristallisation ein. Aus Essigester Schmp. 188–189°, $[\alpha]_D^{20}$: –32.1 ± 0.5°, $[\alpha]_{546}^{20}$: –38.1° (*c* = 1.9, in Methanol). Ausb. 75.8 g (93.5% d. Th.).

$C_{26}H_{30}N_4O_7$ (510.5) Ber. C 61.16 H 5.92 N 10.98 Gef. C 61.41 H 5.99 N 10.85

9. *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanin-hydrazid-trifluoressigsäure* [5-6b]: 25.8 g *PHT-BOC-Derivat* [5-6a] werden mit 150 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und bei Raumtemperatur bis zur völligen Lösung stehengelassen. Nach 2 Stdn. destilliert man die überschüss. *Trifluoressigsäure* i. Vak. ab und verreibt den Rückstand mit Äther (Kristallisation). Das Rohprodukt wird abgesaugt, i. Vak. über KOH/P₂O₅ getrocknet und mit Äther unter Rückfluß behandelt. Schmp. 159–161° (nach vorherigem Erweichen), $[\alpha]_D^{20}$: –17.0 ± 1° (*c* = 1, in Methanol), $[\alpha]_{546}^{20}$: –20.94°. Ausb. 23.6–24.1 g (90–92% d. Th.).

$C_{21}H_{23}N_4O_5$]CF₃CO₂ (524.4) Ber. C 52.67 H 4.42 N 10.68 F 10.87
Gef. C 52.38 H 4.48 N 10.88 F 10.82

10. *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanin-benzylester* [5-6c]: 37.5 g (0.15 Mol) *Phthalyl-threonin*, 45 g *Phenylalanin-benzylester-hydrochlorid* und 21 ccm *Triäthylamin* werden in Acetonitril bis zur Lösung gerührt, nach Abkühlen auf –10° mit 31 g *DCCD* versetzt und 5 Stdn. gerührt. Man läßt bei –10° über Nacht stehen, rührt dann 2 Stdn. bis zum Erreichen von Raumtemperatur und arbeitet wie üblich auf. Beim Einengen der Essigesterlösung i. Vak. auf kleines Vol. tritt Kristallisation ein. Aus Essigester Schmp. 130–130.5°. Ausb. 66.9 g (91.6% d. Th.).

$C_{28}H_{26}N_2O_6$ (486.5) Ber. C 69.12 H 5.39 N 5.76 Gef. C 68.95 H 5.48 N 5.90

11. *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanin* [5-6d]: 65 g *Phthalyl-peptid-benzylester* [5-6c] werden in Methanol 4 Stdn. wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Aus Essigester/Petroläther oder Äthanol/Wasser Schmp. 206.5–208°. $[\alpha]_D^{20}$: +23.38 ± 0.5°, $[\alpha]_{546}^{20}$: +28.40° (*c* = 1.6, in Äthanol). Ausb. 50.0–51.8 g (95–99% d. Th.).

$C_{22}H_{20}N_2O_6$ (396.4) Ber. C 63.63 H 5.09 N 7.07 Gef. C 63.81 H 5.24 N 7.10

12. *tert*.-Butyloxycarbonyl-*L*-phenylalanin [6e]: 150 g *Phenylalanin-äthylester-hydrochlorid* in möglichst wenig Chloroform werden bei –5° mit der ber. Menge 2*n* NH₃ in Chloroform

umgesetzt. Nach Abfiltrieren von Ammoniumchlorid dampft man die Lösung i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in Äther auf (evtl. filtrieren) und engt i. Vak. ein. Das verbleibende Öl wird mit 280 g *BOC-Azid* übergossen und 20 Stdn. bei 45° Badtemp. gerührt. Überschüss. *BOC-Azid* wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Citronensäurelösung, Wasser und NaCl-Lösung wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft. Das erhaltene Öl wird portionsweise in wäbr. Dioxan mit 285 ccm 2*n* NaOH (Thymolphthalein als Indikator) verseift. Unter Eiskühlung und Rühren neutralisiert man vorsichtig mit 285 ccm 2*n* HCl, destilliert Dioxan weitgehend i. Vak. ab, sättigt die Restlösung mit NaCl und extrahiert mit Äther. Aus den über Natriumsulfat getrockneten Ätherphasen fällt man nach Zusatz von Petroläther *BOC-Phenylalanin* als Dicyclohexylammoniumsalz aus; es wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausb. 209 g (72% d. Th.). Das Salz wird, suspendiert in Essigester, mit überschüss. wäbr. Citronensäurelösung bis zur Lösung geschüttelt. Die wäbr. Phase wird 2mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen werden wie üblich gewaschen und aufgearbeitet; der erhaltene ölige Rückstand, in Äther aufgenommen, kristallisiert auf vorsichtige Zugabe von Petroläther (rasch nach Animpfen). Schmp. 85–87°, $[\alpha]_D^{20}$: $-4.1 \pm 0.2^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -4.5° ($c = 5$, in Essigsäure), $[\alpha]_D^{20}$: $+24.7 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+29.85^\circ$ ($c = 1.5$, in Äthanol). Ausb. 112 g (65% d. Th.).

C₁₄H₁₉NO₄ (265.3) Ber. C 63.38 H 7.22 N 5.28 Gef. C 63.51 H 7.38 N 5.14

13. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [6-8a]

a) *DCCD-Methode*: 5.3 g *BOC-Phenylalanin* (20 mMol) und 8.9 g *Threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [7-8b] in Acetonitril/Dimethylformamid werden bei –5° mit 4.2 g *DCCD* versetzt und 3 Stdn. gerührt. Nach 48stdg. Stehenlassen im Kühlschrank bei –5° rührt man bis Erreichen der Raumtemperatur und filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff nach Abkühlen ab. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Lösung wie üblich gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingengt. Aus Essigester Schmp. 164–165.5°, $[\alpha]_D^{20}$: $-11.96 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -14.75° ($c = 0.5$, in Methanol). Ausb. 11.7 g (84.5% d. Th.).

C₃₆H₄₅N₅O₉ (691.8) Ber. C 62.51 H 6.56 N 10.12 Gef. C 62.88 H 6.70 N 10.34

b) *Anhydridmethode*: 39.8 g (0.15 Mol) *BOC-Phenylalanin* und 21 ccm *Triäthylamin* in 500 ccm Tetrahydrofuran werden bei –10° mit 14.4 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach 10 Min. tropft man eine Lösung von 67 g *Threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* in 700 ccm Tetrahydrofuran bei –15° zu. Man rührt 4 Stdn. bei Raumtemperatur und läßt über Nacht im Kühlschrank stehen. Der nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. erhaltene Rückstand wird zwischen viel Essigester und Wasser verteilt und die abgetrennte Essigesterphase rasch mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Einengen i. Vak. und Benzolzusatz nimmt man in frischem Essigester auf und läßt kristallisieren. Schmp. 163–165°, Ausb. 92.3 g (91%, bez. auf umgesetztes Dipeptidderivat). (Aus der Citratlösung wurden 1.7 g nicht umgesetztes Dipeptidderivat zurückgewonnen.)

14. *L-Phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [6-8b]: 89.7 g *BOC-Derivat* [6-8a] werden mit 200 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und unter Kühlung bis zur völligen Lösung geschüttelt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. abgezogen und der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Die stark abgekühlte Lösung schüttelt man mit eiskalter, überschüss. NaHCO₃-Lösung und wäscht rasch mit Wasser alkalifrei; dabei beginnt das Produkt auszufallen. Die Fällung läßt man in der Kälte vollständig werden. Nach Digerieren mit Wasser wird abfiltriert

und der Filtrerrückstand über P_2O_5 i. Hochvak. bei 40° getrocknet. Schmp. $168-174^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $-23.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -29.0° ($c = 0.8$, in Methanol). Ausb. 70.8 g (92.5% d. Th.).

$C_{31}H_{37}N_5O_7$ (591.7) Ber. C 62.90 H 6.30 N 11.84 Gef. C 62.78 H 6.27 N 11.98

15. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonin-dicyclohexylammoniumsalz* ([5b]-DCHA): 131 g *Threonin-äthylester* (aus *L*-Threonin in 92-proz. Ausb. durch Verestern mit HCl/Äthanol und Freisetzen des Hydrochlorids mit NH_3 erhalten) und 330 g *BOC-Azid* werden 40 Stdn. bei 45° Badtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des überschüss. Azids i. Vak. nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit Kaliumhydrogencarbonat- und Citronensäurelösung, Wasser und Natriumchloridlösung und trocknet über Natriumsulfat. Nach Einengen i. Vak. hinterbleibt ein Öl. Ausb. 202 g *BOC-Threonin-äthylester*.

202 g des Öls in Dioxan werden mit 820 ccm *nNaOH* wie üblich verseift (Thymolphthalein). Unter Eiskühlung neutralisiert man mit 820 ccm *nHCl*, destilliert das Dioxan i. Vak. ab und extrahiert den Rückstand mit Äther. Die Ätherphasen werden mit NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das erhaltene Öl wird in Äther aufgenommen und nach Zugabe von wenig Petroläther mit 148.5 g *Dicyclohexylamin* versetzt. Beim Stehenlassen über Nacht bei -10° erfolgt die Abscheidung des Salzes; es wird abfiltriert und mit Äther/Petroläther gewaschen. Nach Trocknen i. Vak. über P_2O_5 Schmp. 153.5 bis 154.5° , $[\alpha]_D^{20}$: $+14.1 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+16.4^\circ$ ($c = 2$, in Äthanol). Ausb. 275 g (77.25% d. Th. bzw. 70.5%, bez. auf Threonin).

$C_{21}H_{40}N_2O_5$ (400.6) Ber. C 62.97 H 10.07 N 6.99 Gef. C 62.75 H 9.98 N 7.14

16. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanin-benzylester* [5-6e]: 40.06 g (100 mMol) *BOC-Threonin-DCHA-Salz* und 29.2 g (100 mMol) *Phenylalanin-benzylester-hydrochlorid* [6d] in Acetonitril/Tetrahydrofuran (600 ccm, 3:1) werden 4 Stdn. gerührt; nach Abkühlen wird das DCHA-Hydrochlorid abfiltriert (21.5 g, ber. 21.6 g). Zum Filtrat werden bei -10° 20.6 g *DCCD* gegeben, der Ansatz wird 2 Stdn. gerührt, über Nacht bei -10° stehengelassen und anschließend 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen wird die filtrierte Lösung i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in viel Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Aus Essigester und wenig Petroläther Schmp. $137.5-138.5^\circ$. Ausb. 40 g (88% d. Th.).

$C_{25}H_{32}N_2O_6$ (456.6) Ber. C 65.77 H 7.07 N 6.14 Gef. C 65.61 H 6.97 N 6.04

17. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanin* [5-6f]: 40 g *BOC-Peptid-benzylester* [5-6e] in wäbr. Methanol werden wie üblich (Pd-Schwarz) bis zur Aufnahme von 1 Mol H_2 (ca. 9 Stdn.) hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in viel Essigester aufgenommen und mit Kaliumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die wäbr. Extrakte säuert man unter Eiskühlung mit Citronensäure an und extrahiert unter NaCl-Sättigung mit Essigester/Äther. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Nach Trocknen des Rückstandes i. Hochvak. amorphes Pulver, Ausb. 32.2 g (96.5% d. Th.).

18. *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8a]

a) Aus *Phthalyl-threonin* und *Phenylalanyl-threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [6-8b], hergestellt unter 14.): 5.0 g *Phthalyl-threonin* und 12.0 g *Tripeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [6-8b] in Acetonitril werden bei -10° mit 4.2 g *DCCD* 12 Stdn. gerührt, anschließend weitere 2 Stdn. bei Raumtemperatur unter Dimethylformamid-Zusatz. Die nach Abkühlen filtrierte Lösung wird i. Vak. eingeeengt, der verbleibende Rückstand in viel Essigester aufgenommen und rasch mit verd. Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Dabei tritt gallertige Fällung auf, die man im Kühlschranks vollständig werden läßt. Man filtriert ab und dampft die Essigestermutterlauge i. Vak. zur Trockne. Die

vereinigten Rückstände werden mit Wasser verrieben und gut abgenutscht. Aus Äthanol Schmp. um 150° (130°), $[\alpha]_D^{20}$: $-23.26 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -27.9° ($c = 1$, in Methanol) (für alkoholfreies Produkt $[\alpha]_{546}^{20}$: -28.75° ber.). Ausb. 12.6 g ($\sim 77\%$ d. Th.).

$C_{43}H_{46}N_6O_{11} \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (845.9) Ber. C 62.47 H 5.84 N 9.94 Gef. C 62.20 H 5.57 N 9.92

b) Aus *Phthalyl-threonyl-phenylalanin* [5-6d] und *Threonyl-O-benzyl-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* [7-8b]: 47.6 g (0.12 Mol) *Phthalyl-dipeptid* [5-6d] und 53.5 g *Dipeptid-benzylloxycarbonylhydrazid* [7-8b] in Acetonitril/Dimethylformamid werden bei -10° unter Rühren mit 24.8 g *DCCD* in Acetonitril umgesetzt. Man rührt 4 Stdn. bei -10° , läßt 2 Tage bei -10° stehen, rührt 3 Stdn. bei Raumtemperatur und filtriert nach Abkühlen 26.8 g Harbstoff (ber. 26.88 g) ab. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und der Rückstand mit heißem Essigester behandelt, wobei Lösung eintritt, gefolgt von rascher Kristallisation. Nach Abkühlen wird abgesaugt. Den getrockneten Filtrerrückstand löst man in warmem Dimethylformamid und fügt ca. 1 Vol. Wasser zu. Bei Abkühlen tritt Kristallisation ein. Das Produkt wird i. Vak. über P_2O_5 scharf getrocknet, anschließend i. Hochvak. (10^{-3} Torr) bei 80° , Schmp. $159-165^{\circ}$ (stark hygroskop.). R_F 0.90 (n-Butanol/Essigsäure/ H_2O 6:2:2), $[\alpha]_D^{20}$: $-23.3 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -28.5° ($c = 1$, in Methanol). Ausb. 84 g (85% d. Th.).

$C_{43}H_{46}N_6O_{11}$ (822.9) Bei. C 62.76 H 5.64 N 10.21 Gef. C 62.47 H 5.66 N 10.24

c) Aus *Phthalyl-L-threonyl-L-phenylalanin-hydrazid*: CF_3CO_2H [5-6b] und *Threonyl-O-benzyl-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* [7-8b]: 26.25 g *Phthalyl-dipeptid-hydrazid-trifluoacetat* [5-6b] in Essigsäure und 50 ccm *nHCl* werden mit 3.45 g *NaNO_2* in wenig Wasser bei 0° umgesetzt. Das *Azid* kristallisiert nach kurzem Schütteln aus; es wird abfiltriert, in kaltem Essigester aufgenommen und mit eiskalter $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Nach kurzem Trocknen über Natriumsulfat wird mit einer Lösung von 22.25 g *Threonyl-O-benzyl-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* [7-8b] in Dimethylformamid/Essigester vereinigt. Das Gemisch läßt man 72 Stdn. bei 0° , dann 48 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach Abkühlen auf 0° wird der Niederschlag abgesaugt: 33.5 g (Schmp. $160-165^{\circ}$, nach Trocknen). Das Filtrat (Essigesterlösung) wird wie üblich gewaschen*) und aufgearbeitet, der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert: 0.5 g. Die 1. und 2. Fraktion werden zusammen aus Äthanol umkristallisiert, Schmp. $\sim 150^{\circ}$ (Erweichen bei 130°), $[\alpha]_D^{20}$: $-22.42 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -27.1° ($c = 1$, in Methanol) (ber. für alkoholfreies Produkt $[\alpha]_{546}^{20}$: -28.0°). Ausb. 31 g (84% d. Th., bez. auf umgesetztes [7-8b]).

$C_{43}H_{46}N_6O_{11} \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (845.9) Ber. C 62.47 H 5.84 N 9.94 Gef. C 62.31 H 5.77 N 9.96

19. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* [5-8c]

a) Aus *tert.-Butyloxycarbonyl-threonin* [5b] und *Phenylalanyl-threonyl-O-benzyl-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* [6-8b]: 80 g *BOC-Threonin-dicyclohexylammoniumsalz*, suspendiert in Äther, werden mit wäßr. Citronensäurelösung bis zur völligen Auflösung behandelt; die abgetrennte wäßr. Phase wird erschöpfend mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wäscht man mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. zur Trockne ein. Ausb. 43.5 g Öl (fast quantit.).

21.3 g des Öls (= *BOC-Threonin*) und 57.3 g *Tripeptid-benzylloxycarbonylhydrazid* [6-8b] werden in 200 ccm Dimethylformamid und 800 ccm Acetonitril gelöst und bei -10° mit 20 g *DCCD* versetzt. Es wird 4 Stdn. bei -10° gerührt, über Nacht im Kühlschrank bei -10° belassen und dann 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf 0° filtriert man

*) Aus der Salzsäurephase werden nach Alkalischemachen mit $NaHCO_3$, Essigesterextraktion und üblichem Aufarbeiten 2.8 g *Threonyl-O-benzyl-serin-benzylloxycarbonylhydrazid* zurückgewonnen.

vom ausgefallenen Harnstoff ab, engt das Filtrat i. Vak. ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die Essigesterlösung wird wie üblich gewaschen, kurz über Natriumsulfat getrocknet, auf ein kleines Vol. eingengt und über Nacht in der Kühltruhe der Kristallisation überlassen; der Niederschlag wird über P_2O_5 i. Vak. getrocknet, Schmp. (155°) 158–160°, $[\alpha]_D^{20}$: $-21.57 \pm 1^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20}$: -26.11° ($c = 1$, in Methanol); R_F 0.95 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 6:2:2). Ausb. 63.5 g ($\sim 98\%$ d. Th., unter Berücksichtigung zurückgewonnenen Materials).

Aus der Citratlösung werden 8.95 g Tripeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [6-8b] zurückgewonnen.

$C_{40}H_{52}N_6O_{11}$ (792.9) Ber. C 60.59 H 6.60 N 10.60 Gef. C 60.18 H 6.35 N 10.46

b) Aus *tert.-Butyloxycarbonyl-threonyl-phenylalanin* [5-6f] und *Threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [7-8b]: 25.5 g *BOC-Dipeptid* [5-6f] und 30 g *Dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [7-8b] in 700 ccm Acetonitril werden bei -15° 5 Stdn. mit 13.8 g *DCCD* gerührt, dann 48 Stdn. in der Kühltruhe (-5°) aufbewahrt und schließlich unter Zusatz von Dimethylformamid bei Raumtemperatur noch 3 Stdn. gerührt. Nach Abkühlen auf 0° wird vom Harnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingengt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Lösung wäscht man wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser und engt nach Trocknen über Natriumsulfat auf ein kleines Vol. ein, wobei Kristallisation eintritt, die im Kühlschrank vervollständigt wird. Die Kristalle werden i. Vak. über P_2O_5 getrocknet, Schmp. 156–159°, $[\alpha]_D^{20}$: $-23.06 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -27.9° ($c = 1$, in Methanol). Ausb. 48.1 g (90% d. Th.).

$C_{40}H_{52}N_6O_{11}$ (792.9) Ber. C 60.59 H 6.60 N 10.60 Gef. C 60.21 H 6.34 N 10.44

20. *L-Threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8b]

a) Aus *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8a], hergestellt unter 18a): 8.46 g (10.0 mMol) *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8a], in 100 ccm Methanol suspendiert, werden mit 0.5 ccm *Hydrazinhydrat* geschüttelt, wobei langsam Lösung erfolgt. Während 20stgd. Stehenlassens erfolgt gallertige Abscheidung. Man erwärmt unter Zusatz von 0.58 ccm Essigsäure in 30 ccm Methanol auf 50° (30 Min.), läßt abkühlen und erwärmt erneut mit 100 ccm n_{10} HCl auf dem Wasserbad zur Lösung. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur impft man mit Phthalhydrazid an. Im Kühlschrank wird die Fällung vervollständigt. Das Filtrat wird i. Vak. weitgehend vom Methanol befreit und die Restlösung mit 20 ccm n NaOH sowie Wasser behandelt. Der Niederschlag wird kräftig abgenutscht, mit Wasser verrieben und erneut abgenutscht. Nach Trocknen über P_2O_5 i. Vak. kristallisiert man aus Methanol um. Schmp. (135°) 164–167° (nach Trocknen i. Hochvak. bei 45° über P_2O_5), $[\alpha]_D^{20}$: $-14.3 \pm 1.5^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20}$: -18.2° ($c = 0.65$, in Methanol), R_F 0.83 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5). Ausb. 5.25 g (76% d. Th.).

Die gaschromatographische Untersuchung des Partialhydrolysats ergab $\sim 99\%$ L-Thr-L-Phe. Aminosäure-Bestimmung: Thr:Phe:Ser Ber. 2:1:1 Gef. 1.95:1:1.05.

$C_{35}H_{44}N_6O_9$ (692.8) Ber. C 60.68 H 6.40 N 12.13 Gef. C 60.54 H 6.42 N 12.27

b) Aus *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8a], hergestellt unter 18b): 78 g *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8a], in 2 l Methanol suspendiert, werden mit einer Lösung von 9.5 g *Hydrazinhydrat* und 11.11 g *Essigsäure* in 100 ccm Methanol (2.0 Äquivv. Hydrazinacetat) versetzt und diese Mischung unter Rühren 2 Stdn. auf 50° erwärmt. Man konzentriert i. Vak. auf ca. 800 ccm und filtriert nach Abkühlen auf 0° vom ausgefallenen Phthalhydrazid ab. Das Filtrat wird mit $NaHCO_3$ auf pH 8 gebracht und das abgeschiedene *Tetrapeptid-Derivat* kräftig abgenutscht. Es wird sorgfältig mit Wasser verrieben und erneut abgenutscht. Das über P_2O_5 i. Vak. getrocknete Produkt wird aus 4 l Methanol umkristallisiert. Nach Trocknen i. Hochvak. über P_2O_5 bei 45° Schmp. (135°)

163–166°, $[\alpha]_D^{20}$: $-14.86 \pm 1.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{346}^{20}$: -18.49° ($c = 0.66$, in Methanol), R_F 0.83 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5) bzw. 0.72 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 6:2:2). Ausb. 49.5 g (75% d. Th.).

Die gaschromatographische Untersuchung des Partialhydrolysats ergab $\sim 99\%$ L-Thr-L-Phe. Aminosäure-Bestimmung: Thr:Phe:Ser Ber. 2:1:1 Gef. 2:0.98:1.03.

$C_{35}H_{44}N_6O_9$ (692.8) Ber. C 60.68 H 6.40 N 12.13 Gef. C 60.40 H 6.43 N 12.04

c) Aus *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8a]*, hergestellt unter 18c): 25.4 g (30.0 mMol) *Phthalyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8a]* in 400 ccm Methanol werden mit 1.5 ccm *Hydrazinhydrat*, wie unter a) beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Aus 95-proz. Methanol Schmp. (130) 162–166°, $[\alpha]_D^{20}$: $-16.3 \pm 1.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{346}^{20}$: -20.3° ($c = 0.65$, in Methanol), R_F 0.83 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5). Ausb. 16.6 g ($\sim 80\%$ d. Th.).

Die gaschromatographische Untersuchung des Partialhydrolysats ergab $\sim 99\%$ L-Thr-L-Phe. Aminosäure-Bestimmung: Thr:Phe:Ser Ber. 2:1:1 Gef. 1.92:1.03:1.03.

$C_{35}H_{44}N_6O_9$ (692.8) Ber. C 60.68 H 6.40 N 12.13 Gef. C 60.34 H 6.34 N 12.17

d) Aus *tert.-Butyloxycarbonyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8c]*, hergestellt unter 19a): 63 g *tert.-Butyloxycarbonyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8c]* werden mit 250 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und bis zur Lösung geschüttelt. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wird überschüss. *Trifluoressigsäure* i. Vak. abgedampft, der Rückstand (Öl) in Essigester gelöst und mit eiskalter $NaHCO_3$ -Lösung in geringem Überschuß behandelt, wobei der Kolbeninhalt erstarrt. Die Fällung wird, wie unter b) beschrieben, weiterbehandelt. Nach Trocknen i. Hochvak. (10^{-3} Torr) bei 50° über P_2O_5 Schmp. (135°) 164–166°, $[\alpha]_D^{20}$: $-15.1 \pm 1.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{346}^{20}$: -19.07° ($c = 0.65$, in Methanol), R_F 0.83 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5). Ausb. 38.7 g (69.7% d. Th.).

Die gaschromatographische Untersuchung des Partialhydrolysats ergab $\sim 99\%$ L-Thr-L-Phe. Aminosäure-Bestimmung: Thr:Phe:Ser Ber. 2:1:1 Gef. 1.98:1.05:1.05.

$C_{35}H_{44}N_6O_9$ (692.8) Ber. C 60.68 H 6.40 N 12.13 Gef. C 60.69 H 6.18 N 12.32

e) Aus *tert.-Butyloxycarbonyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8c]*, hergestellt unter 19b): 48 g *tert.-Butyloxycarbonyl-tetrapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8c]* werden mit 250 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und 1.5 Stdn. bei Raumtemperatur bis zur völligen Lösung stehengelassen. Überschüss. *Trifluoressigsäure* wird i. Vak. abgedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und mit überschüss. $NaHCO_3$ -Lösung behandelt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und, wie unter b) beschrieben, weiterbehandelt. Nach Trocknen i. Hochvak. bei 50° über P_2O_5 Schmp. (135) 164–166°, $[\alpha]_D^{20}$: $-14.6 \pm 1.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{346}^{20}$: -17.86° ($c = 0.65$, in Methanol), R_F 0.83 (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5). Ausb. 28.7 g (68.5% d. Th.).

Die gaschromatographische Untersuchung des Partialhydrolysats ergab $\sim 99\%$ L-Thr-L-Phe. Aminosäure-Bestimmung: Thr:Phe:Ser Ber. 2:1:1 Gef. 1.95:0.98:0.98.

$C_{35}H_{44}N_6O_9$ (692.8) Ber. C 60.68 H 6.40 N 12.13 Gef. C 60.82 H 6.69 N 11.87