

## ERICH WÜNSCH, GERHARD WENDLBERGER und JOACHIM JENTSCH

Zur Synthese des Glucagons, III<sup>1)</sup>

## Darstellung der Sequenz 9–11

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

(Eingegangen am 5. Juni 1964)

Die Synthese von Trifluoracetyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-tyrosyl-L-serin-hydrazid, einer verknüpfungsfähigen Glucagon-Teilsequenz 9–11, wird beschrieben.

Über die Darstellung zweier Tetrapeptidderivate mit der Sequenz 1–4 und 5–8, die zu einem „verknüpfungsfähigen“ Octapeptid (Teilstück I = Sequenz 1–8) vereinigt werden sollen, ist in zwei vorausgehenden Mitteilungen<sup>1)</sup> berichtet worden.

Mit dem Aufbau eines Undeca-peptid-Derivats der Sequenz 9–19 hoffen wir, ein passendes Teilstück II für eine Totalsynthese des Glucagons in die Hand zu bekommen. Die Darstellung von drei hierzu geeigneten Bruchstücken soll in dieser und in folgenden Arbeiten beschrieben werden.

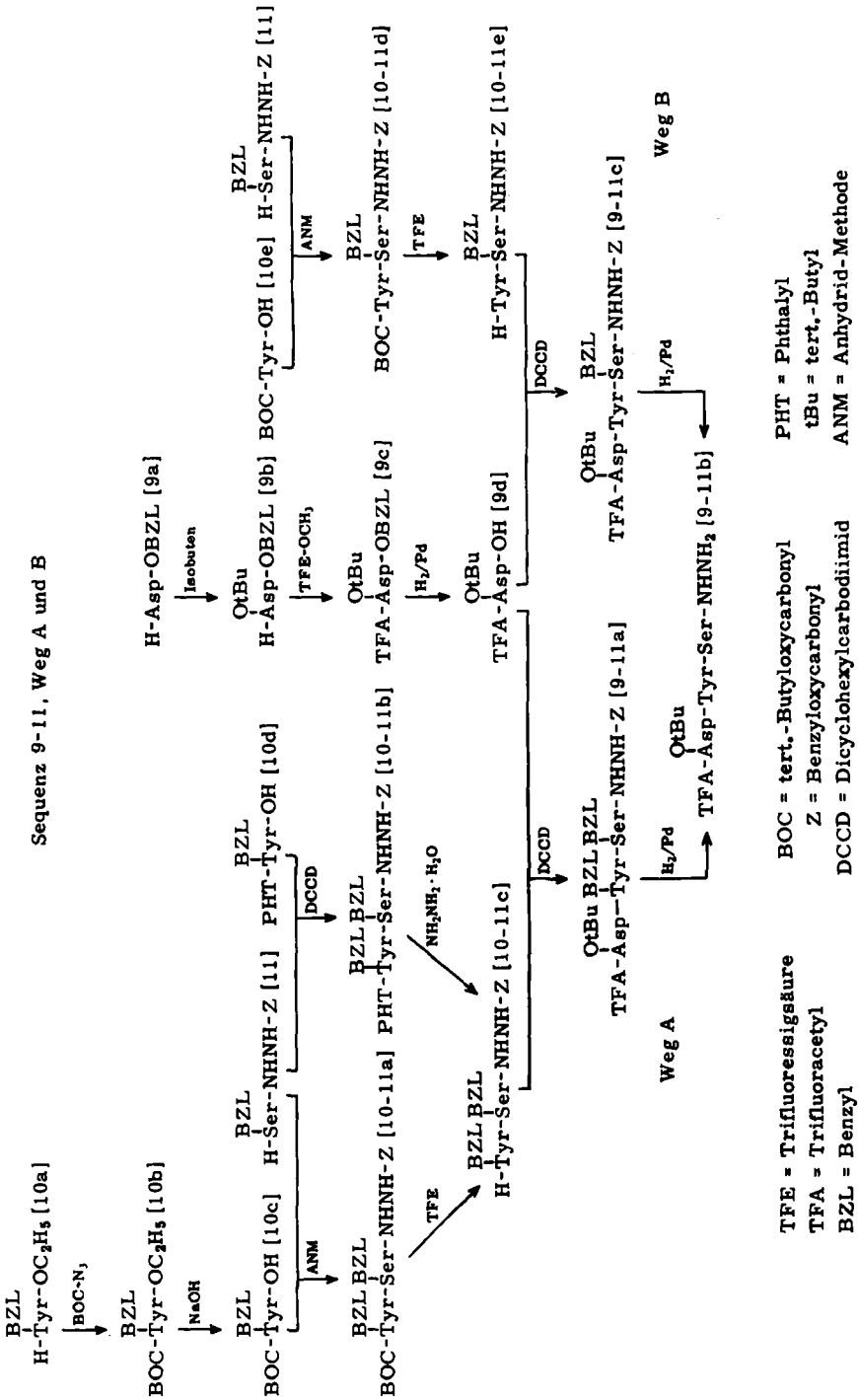
Mit *O*-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [11], das bereits für die Darstellung des Teilstücks 5–8 entwickelt worden war<sup>1)</sup>, stand für die Synthese der Sequenz 9–11 ein geeignetes Ausgangsmaterial zur Verfügung; es konnte mit guter Ausbeute nach der Anhydrid- bzw. Carbodiimid-Methode mit tert.-Butyloxycarbonyl-[10c] bzw. Phthalyl-*O*-benzyl-tyrosin [10d] zu den Acyl-dipeptid-benzyloxycarbonylhydraziden [10-11 a bzw. 10-11 b] verknüpft werden. Lediglich die Darstellung des ersteren Produkts bereitete zunächst Schwierigkeiten; die SCHWYZERSche BOC-Azid-Technik erbrachte nur eine 40-proz. Ausbeute (von diesem Autor schon früher beschrieben<sup>2)</sup>); nach dem ANDERSON-Verfahren<sup>3)</sup> mit tert.-Butyl-nitrophenylcarbonat konnten max. nur ca. 65% erreicht werden. Günstiger gestaltete sich die Einführung des BOC-Restes nach der im hiesigen Labor für BOC-Phenylalanin erfolgreich angewandten Methodik<sup>1)</sup>: freier *O*-Benzyl-tyrosin-äthylester [10a] wurde mit BOC-Azid in großem Überschuß behandelt, der isolierte BOC-ester [10b] mit NaOH zum BOC-*O*-Benzyl-tyrosin [10c] verseift (Ausb. 80%).

Oben genannte Acyl-dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazide [10-11 a bzw. 10-11 b] ließen sich protonensolvolytisch (BOC-Rest) bzw. hydrazinolytisch (Phthalyl-Rest) zum *O*-Benzyl-tyrosyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [10-11 c] entacylieren.

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. 97, 2497 [1964]; II. Mitteil.: E. WÜNSCH und G. WENDLBERGER, ebenda 97, 2504 [1964].

<sup>2)</sup> R. SCHWYZER, P. SIEBER und H. KAPPELER, Helv. chim. Acta 42, 2622 [1959].

<sup>3)</sup> G. W. ANDERSON und A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 [1957].



Über zwei Darstellungsverfahren für Trifluoracetyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [9d] hatten wir schon früher berichtet<sup>4)</sup>; eine zweckmäßige Synthese dieses Ausgangsmaterials gelang uns durch direkte  $\beta$ -Veresterung von Asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester [9a] nach dem ROESKE-Verfahren<sup>5)</sup> und folgende Trifluoracetylierung des Asparaginsäure-diesters [9b] zum Trifluoracetyl-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester- $\beta$ -tert.-butylester [9c] mittels Trifluoressigsäure-methylesters nach WEYGAND<sup>6)</sup>. Hydrogenolytische Spaltung der Benzylester-Gruppe ergab in ausgezeichneter Ausbeute und Reinheit den Trifluoracetyl- $\beta$ -tert.-butylester [9d], isoliert als kristallisiertes DCHA-Salz.

Die Verknüpfung zum TFA-Asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-*O*-benzyl-tyrosyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [9-11a] verlief mit gutem Erfolg, desgleichen die folgende hydrogenolytische Entfernung der Benzyläther- bzw. Benzyloxycarbonylschutzgruppen zum TFA-Asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-tyrosyl-serin-hydrazid [9-11b] (Weg A).

In einem zweiten Weg B haben wir — bedingt durch die umständliche Darstellung von BOC-*O*-Benzyl-tyrosin — BOC-Tyrosin [10e]<sup>3)</sup> mit *O*-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [11] zum öligen, chromatographisch reinen BOC-Dipeptid-Derivat [10-11d] umgesetzt und dieses ohne weitere Charakterisierung durch Trifluoressigsäure-Solvolyse in amorphes Tyrosyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [10-11e] übergeführt.

In Analogie zu Weg A konnte nach dem SHEEHAN-Verfahren das TFA-Tripeptid-Derivat [9-11c] in 76-proz. Ausbeute erhalten werden; die hydrogenolytische Spaltung der Serin-benzyläther- bzw. der Benzyloxycarbonylhydrazid-Gruppen erbrachte in fast quantitativer Ausbeute ein TFA-Tripeptid-hydrazid [9-11b], das in seinen analytischen Daten mit dem nach Weg A gewonnenen Produkt identisch war.

Vorliegende und folgende Arbeiten über Glucagon-Sequenzen wurden uns wiederum durch umfangreiche materielle und finanzielle Unterstützung seitens der FARBENFABRIKEN BAYER AG und den FARBWERKEN HOECHST AG ermöglicht; wir sind beiden Firmen zu hohem Dank verpflichtet.

Frl. U. GRUBER danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

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

1. *O*-Benzyl-*L*-tyrosin-äthylester-hydrochlorid [entspr. 10a]: 50 g *O*-Benzyl-tyrosin werden mit 1 l *n* Äthanol. Salzsäure übergossen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch dampft man i. Vak. zur Trockne ein, behandelt den Rückstand mit 800 ccm heißem Äthanol und setzt nach Abkühlen auf Raumtemperatur 200 ccm 5*n* Äthanol. Salzsäure zu. Diese Prozedur wird noch 3mal wiederholt. Der schließlich erhaltene Rückstand wird in 750 ccm siedendem Äthanol gelöst, vom Unlöslichen abfiltriert und auf ein kleines Vol. eingengt. Aus der warmen Äthanol. Lösung kristallisiert das Ester-hydrochlorid auf Zugabe von

<sup>4)</sup> E. WÜNSCH und A. ZWICK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 108 [1963].

<sup>5)</sup> R. ROESKE, Chem. and Ind. 1959, 1121.

<sup>6)</sup> F. WEYGAND und R. GEIGER, Chem. Ber. 92, 2099 [1959].

Äther aus. Nadeln vom Schmp. 197–198°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +7.95 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +9.90° ( $c = 4$ , in Methanol). Ausb. 58.8 g (95.5% d. Th.).

$C_{18}H_{22}NO_3Cl$  (335.8) Ber. C 64.37 H 6.60 N 4.17 Gef. C 64.15 H 6.72 N 4.08

### 2. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin* [10c]

a) 27.1 g (0.1 Mol) *O-Benzyl-tyrosin* und 21.5 g  $Na_2CO_3$  + 10 H<sub>2</sub>O in 100 ccm Wasser und 150 ccm *tert.-Butylalkohol* werden mit 37.0 g (0.16 Mol) *tert.-Butyl-nitrophenylcarbonat* 30 Min. auf dem Wasserbad erwärmt, der Alkohol im Luftstrom entfernt, die restliche Lösung im Kühlschrank aufbewahrt und schließlich vom ausgefallenen Na-Salz des *p*-Nitrophenols filtriert.

Die erhaltene Lösung wird mit Citronensäure auf pH 3 gestellt und mit Äther mehrmals extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge hinterlassen nach üblichem Neutralwaschen, Trocknen und Einengen i. Vak. ein Öl, das beim Behandeln mit Petroläther kristallisiert. Aus Äther/Petroläther blaßgelbe Kristalle, Schmp. 109–111°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +27.6 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +33.7° ( $c = 2$ , in Äthanol). (Lit.<sup>2)</sup>: Schmp. 109–110°. Ausb. 25.4 g (67% d. Th.).

b) 12.76 g *O-Benzyl-L-tyrosin-äthylester-hydrochlorid* (38 mMol) werden in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung gekühlt und mit einer wäbr. Lösung von 5.27 Kaliumcarbonat (38 mMol) versetzt. Das ausfallende farblose Öl wird mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherfraktionen über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nach Abziehen des Äthers i. Vak. erhält man in nahezu quantitativer Ausbeute ein farbloses Öl.

Zu 11.1 g *O-Benzyl-tyrosin-äthylester* [10a] (37 mMol, als Öl) in 20 ccm Pyridin werden unter Rühren innerhalb von 15 Min. 10.8 g *BOC-Azid* (86 mMol) zugetropft. Nach 28 Stdn. Rühren bei 45° Badtemperatur und 40 Stdn. bei Raumtemperatur werden Pyridin und überschüss. BOC-Azid i. Vak. abgezogen. Der ölige Rückstand wird in 40 ccm Dioxan und 20 ccm Wasser aufgenommen und mit 4 ccm 10 *n* NaOH verseift. Beim vorsichtigen Neutralisieren mit verd. Salzsäure scheidet sich ein Öl ab, das in Äther aufgenommen wird. Die vereinigten Ätherfraktionen werden einmal mit verd. Citronensäurelösung und zweimal mit NaCl-gesätt. Wasser gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und i. Vak. eingedampft. Farbloses Öl, das aus Äther/Petroläther kristallisiert und aus dem gleichen Gemisch umkristallisiert wird, Schmp. 112.5–114°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +27.44 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +33.31° ( $c = 2$ , in Äthanol). Ausb. 11.8 g (80% d. Th.).

$C_{21}H_{25}NO_5$  (371.4) Ber. C 67.91 H 6.78 N 3.77 Gef. C 68.12 H 6.70 N 3.72

### 3. *Phthalyl-O-benzyl-L-tyrosin* [10d]

a) 20.2 g (75 mMol) *O-Benzyl-tyrosin* werden in 350 ccm Dioxan/Wasser (1 : 2.5) und 20.4 g (75 mMol)  $Na_2CO_3$  + 10 H<sub>2</sub>O bei 70° gelöst. Unter Rühren gibt man bei 45° 24.2 g (110 mMol) *N-Äthoxycarbonyl-phthalimid*<sup>7)</sup> zu, das sich unter pH-Abfall von 9 auf 7.5 alsbald auflöst. Nach 12 Stdn. Rühren bei 40° kühlt man bis Erreichen von Raumtemperatur ab und filtriert. Das Filtrat wird nach Ansäuern i. Vak. weitgehend vom Dioxan befreit.

Der erhaltene Niederschlag wird unter Zusatz von Aktivkohle aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert, Nadeln vom Schmp. 212–214°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –226.4 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –275.5° ( $c = 1$ , in Pyridin). Ausb. 21.9 g (73% d. Th.).

$C_{24}H_{19}NO_5$  (401.4) Ber. C 71.81 H 4.77 N 3.49 Gef. C 71.62 H 4.71 N 3.38

b) Unter Rühren vereinigt man die Lösungen von 4.45 g (30 mMol) *Phthalsäureanhydrid* in 130 ccm Dioxan, 8.15 g (30 mMol) *O-Benzyl-tyrosin* + 4.17 ccm Triäthylamin in 40 ccm Wasser, fügt nach 1 Stde. 130 ccm Dioxan und 4.17 ccm Triäthylamin hinzu und erhitzt solange zum Sieden, bis das übergelende Destillat den Siedepunkt von reinem Dioxan

<sup>7)</sup> G. H. L. NEFKENS, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 79, 688 [1960].

besitzt<sup>8)</sup>. Insgesamt werden 270 ccm abdestilliert (Gemisch Triäthylamin/Wasser/Dioxan). Nach Abkühlen und Filtrieren entfernt man das Dioxan weitgehend i. Vak. und behandelt den Rückstand mit *n* HCl im Überschuß; dabei tritt Kristallisation ein. Aus 80-proz. Äthanol Schmp. 212–214°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-226.9 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-276.1^\circ$  ( $c = 1$ , in Pyridin). Ausb. 5.6 g (46.5% d. Th.).

4. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11a]: 50.7 g (0.136 Mol) *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin* [10c] löst man in 250 ccm Tetrahydrofuran, kühlt auf  $-15^\circ$  ab, läßt unter Rühren 19.4 ccm Triäthylamin und anschließend 13.04 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* zutropfen (Temperaturmaximum  $-10^\circ$ ). Nach 15 Min. läßt man eine auf  $-10^\circ$  abgekühlte Lösung von 46.88 g *O-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [11] in 300 ccm Tetrahydrofuran zu der Reaktionsmischung hinzufießen, rührt 5 Stdn. bei  $0^\circ$  nach und läßt 14 Stdn. im Kühlschrank stehen. Anschließend rührt man 2 Stdn. bei Raumtemperatur, filtriert vom ausgefallenen Triäthylamin-hydrochlorid ab und zieht Tetrahydrofuran i. Vak. ab. Der in Essigester aufgenommene Rückstand wird mit Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. weitgehend eingedampft. Der Niederschlag wird abfiltriert, 3 mal mit Äther digeriert und i. Vak. getrocknet, Schmp. (128) 147–148°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-2.8 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-3.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol). Ausb. 78.1 g (82% d. Th.).

$C_{39}H_{44}N_4O_8$  (696.8) Ber. C 67.22 H 6.36 N 8.04 Gef. C 67.34 H 6.56 N 8.25

5. *Phthalyl-O-benzyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11b]: 40.15 (0.1 Mol) *Phthalyl-O-benzyl-tyrosin* [10d] und 34.35 g *O-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [11] in 600 ccm Acetonitril/Dimethylformamid (5 : 1) werden bei  $-10^\circ$  1 Stde. mit 20.0 g DCCD gerührt. Nach 12 Stdn. bei  $-10^\circ$  rührt man die Mischung 4 Stdn. bei Raumtemperatur und filtriert nach Abkühlen auf  $0^\circ$  vom ausgefallenen Harnstoff ab. Das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung wie unter 4. aufgearbeitet. Der resultierende Sirup geht beim Verreiben mit Äther/Petroläther und Stehen im Kühlschrank in ein farbloses amorphes Pulver über, das beim Behandeln mit heißem Methanol kristallisiert. Aus Methanol Schmp. 150.5–151.5°. Ausb. 26.0 g (72% d. Th.).

$C_{42}H_{38}N_4O_8$  (726.8) Ber. C 69.40 H 5.27 N 7.70 Gef. C 69.64 H 5.20 N 7.68

6. *O-Benzyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11c]

a) Aus *BOC-Dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* (hergestellt unter 4.) [10-11a]: 76.2 g *BOC-Dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11a] werden unter Eiswasserkühlung mit 300 ccm *Trifluoressigsäure* versetzt und bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Nach 3 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur dampft man überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. bei 0.1 Torr ab, nimmt den Rückstand in Essigester auf und behandelt die erhaltene Lösung unter Eiskühlung bis zur alkalischen Reaktion mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Während dieser Operation fällt das Dipeptid-Derivat aus; es wird abfiltriert und mehrmals mit Wasser digeriert. Aus Äthanol/Wasser Schmp. 117–118°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-9.73 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-11.99^\circ$  ( $c = 1$ , in Methanol). Ausb. 55.95 g (85.7% d. Th.).

$C_{34}H_{36}N_4O_6$  (596.7) Ber. C 68.44 H 6.08 N 9.39 Gef. C 68.42 H 6.22 N 9.38

b) Aus *PHT-Dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* (hergestellt unter 5.): 14.53 g *PHT-Dipeptid-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11b], suspendiert in 200 ccm Methanol, werden mit 1 ccm *Hydrazinhydrat* versetzt und 20 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen; hierbei tritt zunächst Lösung, dann gallertige Fällung ein.

Nach Zusatz von 1.2 ccm Eisessig erwärmt man das Reaktionsgemisch bis zur Lösung auf dem Wasserbad, kühlt ab und versetzt mit 20 ccm *n* HCl und 100 ccm Wasser. Nach

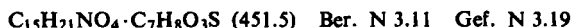
<sup>8)</sup> E. HOFFMAN und H. SCHIFF-SHENHAV, J. org. Chemistry 27, 4686 [1962].

Belassen im Kühlschrank filtriert man vom Niederschlag ab und engt das Filtrat nach Zugabe von 10 ccm 2 *n* NaOH und wenig Natriumhydrogencarbonat-Lösung i. Vak. bei möglichst tiefer Temperatur auf ein kleines Vol. ein. Der Rückstand wird erschöpfend mit Essigester extrahiert, die vereinigten Auszüge mit Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das erhaltene Öl kristallisiert aus Methanol/Wasser, Schmp. 116–117°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-9.65 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-11.8^\circ$  ( $c = 1$ , in Methanol), Ausb. 9.0 g (ca. 65% d. Th.).

7. *L-Tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11e]: 28.1 g *BOC-Tyrosin*<sup>3)</sup> [10e] in 150 ccm Tetrahydrofuran werden bei  $-10^\circ$  und unter Rühren mit 14 ccm Triäthylamin und anschließend tropfenweise mit 9.6 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach 10 Min. läßt man 34.3 g *O-Benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [11] in 400 ccm Tetrahydrofuran rasch zufließen, rührt 4 Stdn. bei  $0^\circ$  nach und bewahrt über Nacht im Kühlschrank auf. Anschließend wird 2 Stdn. bis zum Erreichen der Raumtemperatur gerührt, filtriert und i. Vak. eingedampft. Die Essigesterlösung des erhaltenen Rückstandes wird bei  $0^\circ$  wie üblich gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingeeengt.

Das verbleibende Öl wird nach scharfem Trocknen i. Hochvak. über  $P_2O_5$  mit 200 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und 2 Stdn. bis zur Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Entfernung der überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. (0.1 Torr) wird der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung bis zur alkalischen Reaktion geschüttelt, mit Wasser neutral gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. eingedampft. Amorphes Pulver. Ausb. 45.9 g (91% d. Th.).

8. *L-Asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester- $\beta$ -tert.-butylester-*p*-toluolsulfonat* [*9b-p-Toluolsulfonat*]: 29 g *p-Toluolsulfonsäure* in 240 ccm Aceton versetzt man mit 24 g *Asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester*<sup>9)</sup>, kühlt auf  $0^\circ$  ab und fügt unter Schütteln 300 ccm *Isobuten* zu. Nach 19tägigem Aufbewahren unter Verschuß bei Raumtemperatur wird auf  $-5^\circ$  gekühlt, das kristalline Produkt abfiltriert, mit trockenem Äther gewaschen und i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet (Frakt. 1). Das Filtrat dampft man i. Vak. bei  $+5^\circ$  Badtemperatur zur Trockne ein (Frakt. 2). Die beiden Fraktionen werden getrennt aus Äthanol/Äther umkristallisiert, Schmp.  $169^\circ$ .  $R_F$  0.66 (Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig/Wasser 4:6:2:1),  $R_F$  0.68 (Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin 5:1:1). Ausb. 42.2 g (87% d. Th.).



9. *Trifluoracetyl-L-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester- $\beta$ -tert.-butylester* [9c]: Zu einer Mischung von 3.61 g *Asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester- $\beta$ -tert. butylester-*p*-toluolsulfonat*, 1.53 g *Trifluoressigsäure-methylester* und tert.-Butylalkohol gibt man unter Rühren 0.97 g Triäthylamin. Nach 16 Stdn. engt man am Rotationsverdampfer i. Vak. ein. Man erhält ein farbloses zähes Öl, dessen Essigester/Benzol-Lösung nach Zusatz von wenig Äther beim Anreiben Triäthylamin-*p*-toluolsulfonat abscheidet. Es wird abfiltriert und mit Äther gewaschen. Das Filtrat hinterläßt nach Eindampfen i. Vak. ein farbloses Öl, das erschöpfend mit Petroläther extrahiert wird. Aus dieser Lösung scheiden sich in der Kühltruhe ( $-10^\circ$ ) lange farblose, verfilzte Nadeln ab, Schmp. 53–54°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-34.04 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-40.48^\circ$  ( $c = 1.1$ , in Äthanol) (Lit.<sup>4)</sup>: Schmp. 52–54°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-32.6 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-39.4^\circ$ ).  $R_F$  0.78 (Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin 5:1:1), Ausb. 2.7 g (90% d. Th.).

10. *Trifluoracetyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-benzyl-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [9-11a]: 45.0 g *TFA-Asparaginsäure-β-tert.-butylester-DCHA-Salz*<sup>\*)</sup>, in

\*) Hergestellt aus [9c] durch hydrogenolyt. Benzylesterspaltung nach E. WÜNSCH und A. ZWICK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 112 [1963].

9) P. M. BRIANT, R. H. MOORE, P. J. PIMLOTT und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] 1959, 3868.

Essigester suspendiert, werden mit überschüss. wäbr. Citronensäurelösung behandelt, bis völlige Lösung erreicht ist. Die abgetrennte Essigester-Phase wäscht man je 3 mal mit wenig Wasser und gesätt. Natriumchloridlösung, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. ein.

Das erhaltene Öl (26.5 g) wird zusammen mit 51.9 g *O-Benzyl-tyrosyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11 c] in 750 ccm Acetonitril gelöst, bei  $-15^{\circ}$  mit 18 g *DCCD* versetzt und mehrere Stdn. bei  $-15^{\circ}$  gerührt, wobei Harnstoff und Peptid-Derivat ausfallen. Letzteres wird durch Zugabe von 200 ccm Dimethylformamid in Lösung gebracht, die Mischung bei  $-15^{\circ}$  insgesamt 9 Stdn. weitergerührt. Nach Aufbewahren im Kühlschrank über Nacht ( $-10^{\circ}$ ) rührt man noch 6 Stdn. bis Erreichen von Raumtemperatur, kühlt ab und filtriert vom abgeschiedenen Harnstoff. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Aus dieser Lösung fällt die Verbindung in der Kühltruhe aus. Nach Umkristallisieren aus wenig Methanol Schmp.  $191-192^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-13.77 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-16.95^{\circ}$  ( $c = 1.5$ , in Methanol). Ausb. 67.9 g (90.5% d. Th.).

$C_{44}H_{48}F_3N_5O_{10}$  (863.9) Ber. C 61.18 H 5.60 N 8.11 Gef. C 61.05 H 5.76 N 8.35

11. *Trifluoracetyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-tyrosyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [9-11 c]: 39.5 g *Tyrosyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [10-11 e] und 22.2 g *TFA-Asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [9 d] (gewonnen aus dem DCHA-Salz, wie unter 10. beschrieben) in 600 ccm Acetonitril werden bei  $-10^{\circ}$  mit 16.06 g *DCCD* versetzt und 2 Stdn. bei dieser Temperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei  $-10^{\circ}$  aufbewahrt und anschließend noch 6 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 160 ccm Dimethylformamid filtriert man die auf  $0^{\circ}$  abgekühlte Lösung und dampft i. Vak. ein. Die Essigesterlösung des öligen Rückstandes wird wie üblich gewaschen und aufgearbeitet, das erhaltene Rohprodukt 2 mal aus wenig Essigester umkristallisiert, Schmp.  $188-190^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.8 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-26.52^{\circ}$  ( $c = 1.4$ , in Methanol). Ausb. 43.1 g (76% d. Th.).

$C_{37}H_{42}F_3N_5O_{10}$  (773.8) Ber. C 57.43 H 5.47 N 9.05 Gef. C 57.42 H 5.57 N 9.30

12. *Trifluoracetyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-tyrosyl-L-serin-hydrazid* [9-11 b]

a) Aus *Trifluoracetyl-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-benzyl-tyrosyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [9-11 a] (hergestellt unter 10.): 12.5 g [9-11 a] (0.01 Mol) in 300 ccm Methanol und 50 ccm Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz 45 Stdn. hydriert. Das Filtrat dampft man i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in heißem Äthanol auf und fällt mit Äther. Das abfiltrierte gallertige Produkt wird nach Trocknen i. Vak. 2 mal aus Äthanol umkristallisiert. Mikrokristallines Pulver vom Schmp.  $190^{\circ}$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-26.3 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-32.2^{\circ}$  ( $c = 1.1$ , in Methanol). Ausb. 7.3 g (94% d. Th.).

$C_{22}H_{30}F_3N_5O_8$  (549.5) Ber. C 48.08 H 5.50 N 12.75 Gef. C 48.27 H 5.71 N 12.48

b) Aus *Trifluoracetyl-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-tyrosyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [9-11 c] (hergestellt unter 11.): 11.6 g [9-11 c] in 450 ccm Methanol und 50 ccm Essigsäure werden in Gegenwart von Pd-Schwarz 45 Stdn. hydriert und wie üblich aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand wird mit Äther verrieben und abfiltriert. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus Äthanol Schmp.  $189^{\circ}$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-25.5 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-31.34^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Methanol). Ausb. quantitativ.

$C_{22}H_{30}F_3N_5O_8$  (549.5) Ber. C 48.08 H 5.50 N 12.75 Gef. C 48.53 H 5.46 N 12.51