

ERICH WÜNSCH und ANTON ZWICK

Zur Synthese des Glucagons, IV¹⁾

Darstellung der Sequenz 12–15

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

(Eingegangen am 5. Juni 1964)

Die Synthese von *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester, einer verknüpfungsfähigen Glucagon-Teilsequenz 12–15, wird beschrieben.

Zur Darstellung eines Peptid-Derivates der Glucagonsequenz 12–15 haben wir Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosin [13]²⁾ mit Leucin-methylester [14] nach der GOLDSCHMIDTSchen Phosphorazo-Methode zum Benzyloxycarbonyl-dipeptidester [13-14a] vereinigt. Der Einsatz von *N,O*-Bis-benzyloxycarbonyl-tyrosin und Benzyloxycarbonyl-tyrosin-hydrazid als Kopfkomponenten nach der SHEEHANSchen Carbodiimid- bzw. Azidmethode hatte stets zu Produkten geführt, aus denen die reinen Peptid-Derivate nur unter großen Ausbeuteverlusten isolierbar waren.

Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucin-methylester [13-14a] ließ sich mit fast quantitativer Ausbeute zum entsprechenden Hydrazid [13-14b] umsetzen, dessen Azid-Verknüpfung mit Asparaginsäure-α-äthylester-β-tert.-butylester [15a]³⁾ ein Gemisch zweier präparativer nicht trennbarer Substanzen lieferte. Der nach alkalischer Hydrolyse ätherlösliche und mit Dicyclohexylamin salzbildende Anteil erwies sich als der gesuchte Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-β-tert.-butylester [13-15b], der ätherunlösliche als Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucinamid oder Bis-[benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucyl]-hydrazin vom Schmp. 187 bis 189°.

Katalytische Hydrogenolyse der Amino- und Phenolhydroxyl-Schutzgruppen führte zum chromatographisch reinen Tripeptid [13-15c] (Weg A).

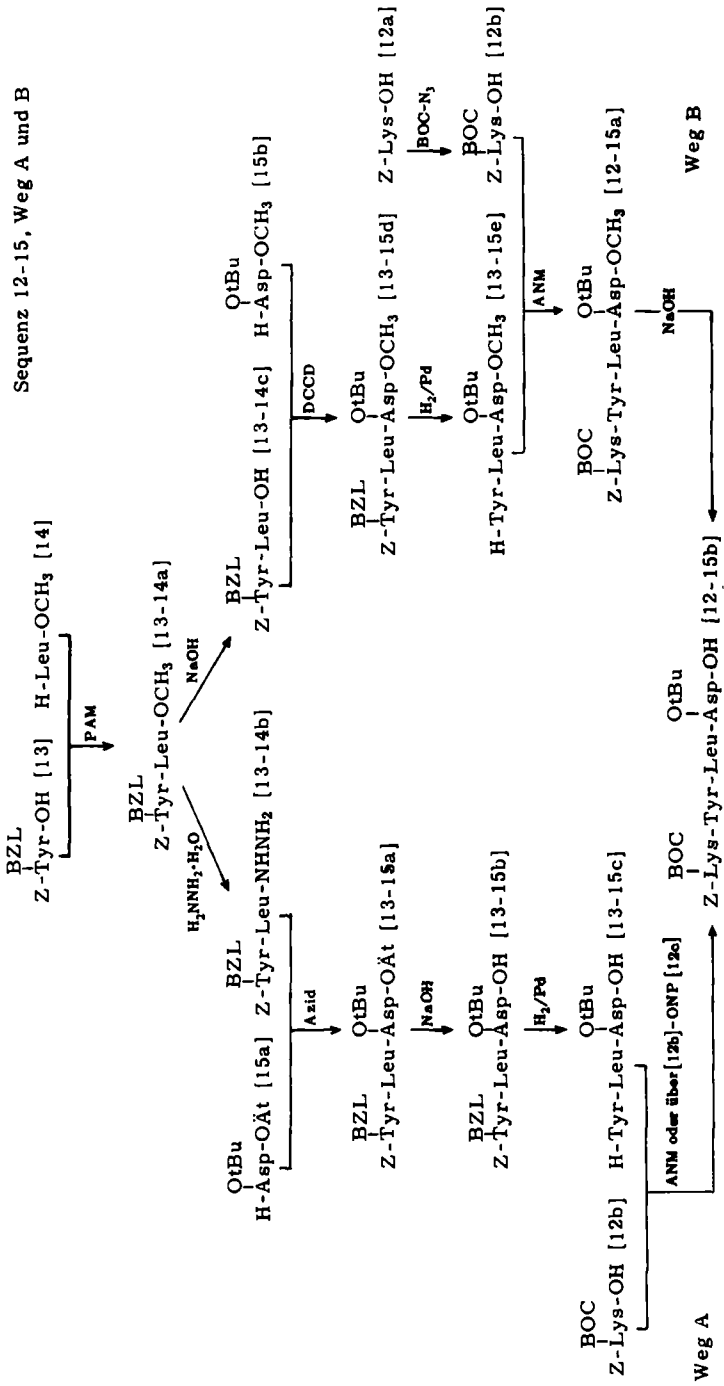
Erfolgreicher war eine Carbodiimid-Synthese von Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-α-methylester-β-tert.-butylester [13-15d] aus Benzyloxycarbonyl-*O*-benzyl-tyrosyl-leucin [13-14c], das in fast quantitativer Ausbeute durch alkalische Verseifung des Acylpeptidesters [13-14a] erhalten werden konnte, und Asparaginsäure-diester [15b].

Die Methodik besitzt den Vorzug des Einsatzes von Asparaginsäure-α-methylester-β-tert.-butylester³⁾, der in freiem Zustand rasch zum Diketopiperazin-Derivat cyclisiert, durch die Anwesenheit des Acyl-dipeptids [13-14c] jedoch während der Reaktionszeit genügend stabilisiert wird (Protonierung).

¹⁾ III. Mittel.: E. WÜNSCH, G. WENDLBERGER und J. JENTSCH, Chem. Ber. 97, 3298 [1964], vorstehend.

²⁾ E. WÜNSCH, G. FRIES und A. ZWICK, Chem. Ber. 91, 542 [1958].

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



BZL = Benzyl
 Ät = Äthyl
 tBu = tert.-Butyl
 ANM = Anhydrid-Methode
 PAM = Phosphorazo-Methode
 ONP = (p)-Nitrophenylester
 Z = Benzylloxycarbonyl
 BOC = tert.-Butylloxycarbonyl
 DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid

Nach hydrogenolytischer Spaltung der Benzyloxycarbonyl- und Benzyläthergruppen konnte der Tripeptidester [13-15e] als Acetat in bester Reinheit und Ausbeute isoliert werden (Weg B).

Der Anbau des Lysins mußte sinnvoll als *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-Derivat [12b] vollzogen werden. Diese Verbindung ist erstmals von SCHWYZER und Mitarb.⁴⁾ durch Benzyloxycarbonylierung von *N*^ε-BOC-Lysin erhalten und für die Peptidsynthese herangezogen worden. Die Darstellung des gemischt-disubstituierten Lysins⁵⁾ erfolgt jedoch zweckmäßiger durch Umsetzung von *N*^α-Benzyloxycarbonyl-lysin [12a] — nach einem von L. ZERVAS und B. BEZAS⁶⁾ gegebenen und von uns modifizierten Verfahren leicht zugänglich — mit BOC-Azid; wir konnten es als DCHA-Salz in kristallisierter Form isolieren.

N^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-lysin [12b] ließ sich nach dem Alkylkohlen säureanhydrid- bzw. nach dem *p*-Nitrophenylester-Verfahren mit dem freien Tripeptid [13-15c] zu identischem *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-β-tert.-butylester [12-15b] umsetzen (Weg A).

Günstigere Resultate konnten jedoch bei der Verknüpfung des Tripeptidesters [13-15e] nach erstgenannter Methode zum *N*-geschützten Tetrapeptidester [12-15a] und anschließender hydrolytischer Spaltung der Methylestergruppierung erzielt werden (Weg B).

Fräulein U. GRUBER und Herrn H. STOCKER danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

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

1. *Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucin-methylester* [13-14a]: Zu einer Phosphorazo-Lösung von 18.2 g (0.1 Mol) *Leucin-methylester-HCl* [entspr. 14] und 4.36 ccm *PCl₃* in 300 ccm Pyridin gibt man 42.5 g (0.1 Mol) *Z-O-Benzyl-tyrosin* [13] und erhitzt 4 Stdn. auf dem Wasserbad. Nach Abkühlen und Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird der verbleibende Rückstand zwischen warmem Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase wie üblich gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingeengt. Auf Zugabe von Äther tritt Kristallisation ein. Aus Essigester/Äther Nadeln vom Schmp. 132.5–133°, $[\alpha]_D^{20}$: $-14.8 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -17.6° ($c = 2$, in Methanol). Ausb. 42.6 g (80% d. Th.).

$C_{31}H_{36}N_2O_6$ (532.6) Ber. C 69.90 H 6.81 N 5.26 Gef. C 70.08 H 6.77 N 5.27

2. *Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucin-hydrazid* [13-14b]: 37.8 g (71 mMol) *Z-O-Benzyl-tyrosyl-leucin-methylester* [13-14a] in 500 ccm Methanol werden mit 10.4 ccm (234 mMol) 100-proz. *Hydrazinhydrat* versetzt, das Gemisch 1 Stde. auf dem Wasserbad erwärmt und 12 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert und sorgfältig mit Methanol gewaschen, Schmp. 191–193°, Ausb. 36.3 g (96% d. Th.).

$C_{30}H_{36}N_4O_5$ (532.6) Ber. C 67.65 H 6.81 N 10.52 Gef. C 68.04 H 6.82 N 10.33

⁴⁾ R. SCHWYZER und W. RITTEL, *Helv. chim. Acta* **44**, 159 [1961].

⁵⁾ Das Lysin-Derivat wurde auf gleichem Wege und unabhängig von uns inzwischen von K. STURM, R. GEIGER und W. SIEDEL, *Chem. Ber.* **96**, 609 [1963] beschrieben.

⁶⁾ *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 719 [1961]; vgl. E. WÜNSCH, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **24**, 112 [1959].

3. *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucin* [13-14c]: 92.2 g (173 mMol) *Z-Dipeptid-ester* [13-14a] in 200 ccm Dioxan werden mit 175 ccm *n* NaOH innerhalb von 30 Min. bei Raumtemperatur verseift und wie üblich aufgearbeitet. Aus der i. Vak. eingeeengten Essigesterlösung fällt das Peptid auf Zugabe von Petroläther aus. Aus Essigester/Äther Schmp. 133.5 bis 135°, $[\alpha]_{D}^{20}$: $-9.0 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -10.5° ($c = 2$, in Methanol). Ausb. 87.0 g (97% d. Th.).

$C_{30}H_{34}N_2O_6$ (518.6) Ber. C 69.48 H 6.61 N 5.40 Gef. C 69.67 H 6.57 N 5.59

4. *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester* [13-15b]

a) *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- α -äthylester- β -tert.-butylester* [13-15a]: 53.2 g (0.1 Mol) *Z-O-Benzyl-tyrosyl-leucin-hydrazid* [13-14b] in Essigsäure und 150 ccm *2n* HCl werden bei 0° mit 7.6 g Natriumnitrit in wenig Wasser umgesetzt. Das ausgefallene Azid nimmt man in Essigester auf, wäscht unter Eiskühlung mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung neutral, trocknet kurz über Natriumsulfat und vereinigt mit der Lösung von 39.8 g (0.1 Mol) *Asparaginsäure- α -äthylester- β -tert.-butylester-tosylat* und 13.8 ccm Triäthylamin in Chloroform. Nach 24 Stdn. bei 0° und 24 Stdn. bei Raumtemperatur wird wie üblich aufgearbeitet (Waschen mit Citronensäure- und Kaliumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und Natriumchloridlösung, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen i. Vak.). Aus der erhaltenen Essigesterlösung kristallisieren auf Zusatz von Petroläther farblose Nadeln, Schmp. 130–136°. Ausb. 56.9 g (Rohprodukt, das sich auch durch Umkristallisieren nicht reinigen läßt; es wird zum Benzoyloxycarbonyl-tripeptid weiter verseift).

b) *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester-Dicyclohexylammoniumsalz* [13-15b-DCHA-Salz]: 56.9 g roher *Z-Tripeptidester* [13-15a] (hergestellt unter 4.a) in 300 ccm Dioxan und 50 ccm Wasser werden mit *n* NaOH (unter Kontrolle des Laugenverbrauchs mit Thymolphthalin als Indikator) verseift. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird angesäuert, das ausfallende Öl in Essigester aufgenommen, die Essigesterextrakte wie üblich gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird 3mal mit heißem Äther extrahiert, die Auszüge nach Abkühlen mit *Dicyclohexylamin* versetzt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert und aus Essigester umkristallisiert, Schmp. 175–177°. Ausb. 40.8 g (47% d. Th., bez. auf Asparaginsäure- α -äthylester- β -tert.-butylester-tosylat).

$C_{50}H_{70}N_4O_9$ (871.1) Ber. C 68.64 H 8.10 N 6.43 Gef. C 68.67 H 7.79 N 6.44

Als ätherunlöslich werden 11.85 g einer Substanz Schmp. 187–189° (*Z-O-Benzyl-tyrosyl-leucinamid*?) isoliert.

c) *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester* [13-15b]: 75.0 g (86 mMol) *Z-Tripeptid-Dicyclohexylammoniumsalz* werden, in Essigester suspendiert, mit etwas mehr als der berechneten Menge wäbr. *Citronensäurelösung* bis zur Lösung geschüttelt. Die abgetrennte Essigesterphase wird mit wenig Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus Essigester/Petroläther Schmp. 78°. Ausb. 58.7 g (99% d. Th. bzw. 46.5%, bez. auf eingesetztes Asparaginsäure- α -äthylester- β -tert.-butylester-tosylat).

$C_{38}H_{47}N_3O_9$ (689.8) Ber. C 66.16 H 6.87 N 6.09 Gef. C 66.02 H 6.72 N 6.33

5. *Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester* [13-15d]: 65.0 g (125 mMol) *Z-O-Benzyl-tyrosyl-leucin* [13-14c] in 700 ccm Acetonitril werden bei -10° mit 17.4 ccm Triäthylamin und 30.5 g (130 mMol) *Asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester-hydrochlorid* zur Lösung gerührt und danach mit 26.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* umgesetzt. Der Ansatz wird 4 Stdn. bei -10° gerührt und 12 Stdn. bei 0° stehengelassen. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand zwischen Wasser

und Essigester/Äther verteilt. Die abgetrennte organische Phase wäscht man mit Citronensäurelösung, 0.1 *n* NH₃ und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt i. Vak. weitgehend ein. Beim Behandeln des Rückstandes mit absol. Äther tritt Kristallisation ein. Aus Essigester/Äther Nadeln, Schmp. 128–129°, $[\alpha]_D^{20}$: $-17.4 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20.9° ($c = 1.7$, in Methanol). R_F 0.71 (n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin 3:1:1), Ausb. 71.5 g (81% d. Th.).

C₃₉H₄₉N₃O₉ (703.8) Ber. C 66.55 H 7.02 N 5.97 Gef. C 66.83 H 6.84 N 6.07

6. *L*-Tyrosyl-*L*-leucyl-*L*-asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester-acetat [13-15 e-Acetat]: 46.0 g (64 mMol) *Z*-Tripeptidester [13-15d] in Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz und Essigsäure 10 Stdn. hydriert. In dem i. Vak. eingeengten Filtrat leitet Ätherzusatz Kristallisation ein. Aus Methanol/Äther Nadeln vom Schmp. 152–154°, $[\alpha]_D^{20}$: $-19.7 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -23.5° ($c = 1.6$, in Methanol). R_F 0.69 (Pyridin/Wasser 65:35), Ausb. 31.1 g (~90% d. Th.).

C₂₄H₃₇N₃O₇·C₂H₄O₂ (539.6) Ber. C 57.87 H 7.66 N 7.79 Gef. C 58.14 H 7.40 N 7.79

7. *L*-Tyrosyl-*L*-leucyl-*L*-asparaginsäure- β -tert.-butylester [13-15 c]: 59.0 g *Z*-Tripeptid [13-15 b] (hergestellt unter 4.) in Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz und Essigsäure 22 Stdn. hydriert und wie üblich aufgearbeitet. (Die hydrogenolytische Entfernung der *O*-Benzyläther-Gruppe wird nach Ende der CO₂-Entwicklung dünn-schicht-chromatographisch verfolgt.) Aus der i. Vak. eingeengten Lösung fällt das Tripeptid auf Zugabe von Diisopropyläther als amorphes Pulver. R_F 0.88 (Lutidin/Collidin 3:1), Ausb. 39.5 g (97% d. Th.).

C₂₃H₃₅N₃O₇· $\frac{1}{2}$ H₂O (474.6) Ber. C 58.21 H 7.64 N 8.85 Gef. C 58.34 H 7.64 N 8.72

8. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysin-Dicyclohexylammoniumsalz

a) *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*L*-lysin [12a]: 175.7 g (0.75 Mol) *N*^ε-Benzyliden-lysin in 375 ccm 2*n* NaOH und 375 ccm Tetrahydrofuran werden bei ca. 0° unter Rühren gelöst, auf -3 bis -5° gekühlt und mit 127.50 g Chlorameisensäure-benzylester und 375 ccm 2*n* NaOH bei pH 8.8 acyliert. (Die Reaktionstemperatur soll dabei 0° nicht übersteigen.) Nach beendeter Zugabe wird 10 Min. bei -3° , dann weitere 10 Min. bei Raumtemperatur nachgerührt. Nach Zugabe von 150 ccm eiskalter 10*n* HCl erhitzt man 5 Min. auf 50°, destilliert anschließend Tetrahydrofuran i. Vak. ab und extrahiert die verbleibende Lösung 2 mal mit Äther. Danach wird mit 2*n* NaOH auf pH 6.2 gestellt, nach kurzem Aufbewahren im Kühlschrank die filtrierte Lösung i. Vak. auf ca. 100 ccm eingeengt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert und über P₂O₅ getrocknet, $[\alpha]_D^{20}$: $-13.7 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -16.1° ($c = 2$, in 0.2*n* HCl), R_F 0.71 (Pyridin/Wasser 80:20) [*N*^ε-Benzyloxycarbonyl-lysin R_F 0.81]. Ausb. 101.5 g (ca. 48.5% d. Th.).

b) *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysin-Dicyclohexylammoniumsalz [12b-DCHA-Salz]: Eine Lösung von 56 g *N*^α-*Z*-Lysin [12a] in 200 ccm Dioxan und 100 ccm 2*n* NaOH werden mit 32 g (ca. 0.22 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-azid und 1 g Magnesiumoxyd versetzt und 24 Stdn. bei 45° gerührt. Das i. Vak. eingeengte Filtrat säuert man mit Citronensäurelösung an, nimmt das ausgefallene Öl in Essigester auf, wäscht die Essigesterphase mit wenig Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. ein. Der in absol. Äther aufgenommene Rückstand wird mit 36.2 ccm Dicyclohexylamin in Äther versetzt, der gebildete Niederschlag abfiltriert und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert, Schmp. 156–157°, $[\alpha]_D^{20}$: $+7.82 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+9.0^\circ$ ($c = 1$, in Äthanol), Ausb. 99.5 g (88.5% d. Th.).

C₃₁H₅₁N₃O₆ (561.7) Ber. C 66.28 H 9.15 N 7.48 Gef. C 66.07 H 9.07 N 7.76

9. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^ε-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysin-*p*-nitrophenylester [12c]: 59.0 g (0.105 Mol) *Z*-*N*^ε-tert.-Butyloxycarbonyl-lysin-Dicyclohexylammoniumsalz (hergestellt unter 8. b) werden zwischen Äther und wäbr. Citronensäurelösung verteilt, die abgetrennte Ätherphase wie üblich gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingeengt. 40.5 g des so erhaltenen Öls in

150 ccm absol. Pyridin werden mit 37.3 g *Bis-[p-nitro-phenyl]-sulfid* versetzt und 16 Stdn. bei 25° gerührt. Anschließend wird Pyridin i. Vak. abdestilliert, der verbleibende Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und die Lösung unter Eiskühlung wie üblich mit Citronensäure-, mit 0.5 m Kaliumcarbonat- und 0.5 m Kaliumhydrogencarbonat-Lösung (1:1) und Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Aceton/Äther, Schmp. 93.5–94.5° nach Umkristallisieren aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch (Lit.: Schmp. 88–91°⁴⁾ bzw. 88–90°⁷⁾). Ausb. 44.2 g (ca. 84% d. Th.).

C₂₅H₃₁N₃O₈ (501.5) Ber. C 59.87 H 6.23 N 8.38 Gef. C 59.80 H 6.36 N 8.47

10. *N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [12-15b]

a) Aus *N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [12b] und *Tripeptid* [13-15c]: 27.4 g *Z-N^ε-tert.-Butyloxycarbonyl-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* (hergestellt wie unter 9. beschrieben) und 10 ccm Triäthylamin in 250 ccm Tetrahydrofuran werden mit 6.85 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* (je 72 mMol) bei –10° umgesetzt. Nach 10 Min. tropft man eine Lösung von 33.5 g (72 mMol) *Tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [13-15c] und 10 ccm Triäthylamin in 600 ccm Tetrahydrofuran und wenig Dimethylformamid bei –10° zu, rührt 1 Stde. bei –10° und 2 Stdn. bis Erreichen von Raumtemperatur. Der nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase wie üblich gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das verbleibende Öl nimmt man in wenig Essigester auf und läßt in Äther einfließen. Auf Zugabe von Petroläther erfolgt amorphe Fällung, Schmp. 132–137°, [α]_D²⁰: –25.4 ± 0.5° bzw. [α]_D²⁰: –30.9° (c = 2, in Methanol). Ausb. 32.2 g (54% d. Th.).

C₄₂H₆₁N₅O₁₂ (827.9) Ber. C 60.92 H 7.43 N 8.46 Gef. C 60.54 H 7.47 N 8.59

b) Aus *N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [12c] und *Tripeptid* [13-15c]: 4.65 g (10 mMol) *Tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [13-15c] in 60 ccm Dioxan und 20 ccm n NaOH werden mit 5.0 g (10 mMol) *Z-N^ε-BOC-Lysin-p-nitrophenylester* versetzt und 6 Stdn. gerührt, wobei mit n NaOH pH 10.6 eingehalten wird. Das Dioxan wird i. Vak. weitgehend abdestilliert, die Restlösung mit Citronensäure angesäuert und die entstandene Fällung in Essigester aufgenommen. Nach Säurefreiwaschen und Trocknen über Natriumsulfat wird i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mit Äther unter Rückfluß digeriert und schließlich aus Essigester/Äther umgefällt, Schmp. 130 bis 136°, [α]_D²⁰: –25.5 ± 0.5° bzw. [α]_D²⁰: –31.0° (c = 2, in Methanol), Ausb. 4.8 g (70% d. Th.).

c) Aus *N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [13-15e]

α) *N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-α-methylester-β-tert.-butylester* [12-15a]: 25.4 g (67 mMol) *Z-N^ε-BOC-Lysin* (hergestellt wie unter 9. beschrieben) und 9.3 ccm Triäthylamin in 250 ccm Tetrahydrofuran werden mit 6.4 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* bei –10° wie üblich umgesetzt und 32.2 g (67 mMol) *Tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-α-methylester-β-tert.-butylester-acetat* (hergestellt wie unter 6.) in 100 ccm Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (1:1) unter Rühren bei –10° zugegeben. Nach 3 Stdn. Rühren bei –10° und 5 Stdn. bei Raumtemperatur dampft man i. Vak. ein und verteilt den Rückstand zwischen Essigester und Wasser. Die abgetrennte Essigesterphase wird wie üblich gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingeeengt, wobei Kristallisation eintritt. Aus wenig Essigester Schmp. 188–189°, [α]_D²⁰: –31.6 ± 1° bzw. [α]_D²⁰: –37.9° (c = 1.4, in Methanol), Ausb. 34.0 g (1. Frakt.).

C₄₃H₆₃N₅O₁₂ (842.0) Ber. C 61.34 H 7.54 N 8.32 Gef. C 61.57 H 7.42 N 8.57

⁷⁾ E. WÜNSCH, H.-G. HEIDRICH und W. GRASSMANN, Chem. Ber. 97, 1818 [1964].

Aus der Mutterlauge wird beim Aufarbeiten eine 2. Frakt. erhalten, Schmp. 175–177°, der sich durch Umkristallisieren nicht steigern ließ. Ausb. 14.3 g (2. Frakt.). (Die Fraktionen werden getrennt verseift.)

β) *N^α-Benzylloxycarbonyl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [12-15b]

1) 34.0 g (38.4 mMol) *Benzylloxycarbonyl-tetrapeptid-methylester* (1. Frakt., hergestellt wie unter 10. c, α)) in 100 ccm Dioxan werden bei Raumtemperatur mit 81 ccm *n* NaOH über 1 Stde. verseift. Unter Eiskühlung und Rühren neutralisiert man mit 81 ccm eiskalter *n* HCl, zieht Dioxan i. Vak. ab und nimmt das abgeschiedene Öl in Essigester auf. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen über Natriumsulfat wird i. Vak. eingedampft, wobei Kristallisation eintritt. Aus Essigester Nadeln vom Schmp. 142–144° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: $-25.7 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -31.5° ($c = 2$, in Methanol), Ausb. 32.55 g.

2) 14.3 g *Benzylloxycarbonyl-tetrapeptid-methylester* (2. Frakt., hergestellt wie unter 10. c, α)) werden, wie oben unter 1) beschrieben, mit 34.2 ccm *n* NaOH verseift und aufgearbeitet. Die erhaltene Essigesterlösung versetzt man mit 3.42 ccm *Dicyclohexylamin*, filtriert nach kurzem Stehenlassen im Kühlschrank den gebildeten Niederschlag ab und wäscht mit eiskaltem Essigester. Nach Trocknen i. Vak. über Phosphorpentoxyd, Schmp. 192–194°. Ausb. 14.82 g.

$C_{54}H_{84}N_6O_{12}$ (1009.3) Ber. C 64.26 H 8.39 N 8.33 Gef. C 64.24 H 8.37 N 8.50

14.8 g des *Dicyclohexylammoniumsalzes* werden in Essigester suspendiert und mit eiskalter *Citronensäurelösung* geschüttelt, bis klare Phasen entstehen. Die abgetrennte Essigester-Phase wird mit Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus Essigester Nadeln vom Schmp. 142–144° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-25.6 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -31.4° ($c = 3$, in Methanol), Ausb. 11.7 g.

Gesamtausb. 44.25 g (ca. 80% d. Th., bez. auf eingesetzten Tripeptidester [13-15e]) über beide Stufen.

$C_{42}H_{61}N_5O_{12}$ (827.9) Ber. C 60.92 H 7.43 N 8.46 Gef. C 60.89 H 7.21 N 8.31