

ERICH WÜNSCH, FRITZ DREES und JOACHIM JENTSCH

Zur Synthese des Glucagons, VII¹⁾

Darstellung der Sequenz 24–29

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

(Eingegangen am 2. September 1964)

Die Synthese von Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyll-L-methionyll-L-asparaginyll-*O*-tert.-butyll-L-threonin-tert.-butylester, der amino- und carboxyl-geschützten Glucagonsequenz 24–29, wird beschrieben.

Kernstück der Synthese des im Glucagonmolekül carboxylendständigen Hexapeptids hatte eine zweckmäßige Darstellungsweise für ein carboxyl-geschütztes Methionyll-asparaginyll-threonin zu sein.

H. C. BEYERMAN und J. S. BONTEKOE²⁾ beschrieben vor kurzem die Synthese dieses Tripeptids als tert.-Butyläther bzw. tert.-Butylester durch Hydrazinolyse des entsprechenden Phthalyl-Derivats. Eine Nacharbeitung dieser Vorschrift erbrachte bei der Stufe des *O*-tert.-Butyll-threonin-tert.-butylesters abweichende Ergebnisse.

Wir haben daraufhin die Bildung von Benzoyloxycarbonyll-*O*-tert.-butyll-threonin-tert.-butylester [29b] studiert und gefunden, daß nach ca. 5 tägiger Reaktionszeit eine etwa 99-proz. Umsetzung von Benzoyloxycarbonyll-threonin [29a] mit Isobuten zu [29b] erzielt werden kann. Der Rest von etwa 1% verteilt sich auf zwei Begleitprodukte, die wir aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens als die Benzoyloxycarbonyll-Derivate von *O*-tert.-Butyll-threonin bzw. Threonin-tert.-butylester ansehen.

Da auch eine längere Reaktionszeit an dem prozentualen Verhältnis der Reaktionsprodukte nichts änderte, müssen wir annehmen, daß ein Gleichgewicht zwischen protonen-katalysierter Kondensation und Solvolyse besteht.

Nach hydrogenolytischer Abspaltung des Benzoyloxycarbonyll-Restes wurde *O*-tert.-Butyll-threonin-tert.-butylester [29c] als Öl erhalten. Da auch dessen Hydrochlorid, Tosylat bzw. Acetat nur als Öle anfielen, blieb die Reindarstellung des Threonin-Derivats vakant³⁾, bis wir in Arylsulfimiden geeignete Salzbildner aufanden.

O-tert.-Butyll-threonin-tert.-butylester-dibenzolsulfimidsalz ließ sich mit Benzoyloxycarbonyll-asparagin-*[p*-nitro-phenylester] [28b]⁴⁾ in Pyridin in Gegenwart von 1 Äquiv. Triäthylamin mit 90% Ausb. zum Benzoyloxycarbonyll-dipeptidester[28-29a]

1) VI. Mitteil.: E. WÜNSCH, Chem. Ber. **98**, 797 [1965], vorstehend.

2) Recueil Trav. chim. Pays-Bas **81**, 699 [1962].

3) Die von H. C. BEYERMAN und J. S. BONTEKOE (Recueil Trav. chim. Pays-Bas **81**, 691 [1962]) zur Charakterisierung des Esters beschriebene Pikratbildung ist für präparative Ansätze nicht verwertbar.

4) M. BODANSZKY und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 [1959].

umsetzen; folgende hydrogenolytische Entfernung der Aminoschutzgruppe ergab quantitativ kristallisierten Asparaginyll-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [28-29 b].

Im Gegensatz zu BEYERMAN und BONTEKOE²⁾ haben wir zunächst den Dipeptidester [28-29 b] mit Trifluoracetyl-methionin-azid zum Trifluoracetyl-methionyl-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [27-29 c] verknüpft. Das Azid wurde aus Trifluoracetyl-methionin [27 b] und BOC-Hydrazid nach Abspaltung der BOC-Gruppe vom Diacylhydrazid [27 c] mit Halogenwasserstoff und üblicher Umsetzung des Trifluoracetyl-hydrazids [27 d] hergestellt.

Erfolgreicher gestaltete sich jedoch die Synthese von [1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-methionyl-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [27-29 a] mit Hilfe des erstmals von E. DANE und Mitarbb.⁵⁾ beschriebenen Kondensationsproduktes [27a] von Methionin-kalium und Benzoylacetone nach dem Alkylkohlen-säure-anhydrid-Verfahren (nach den Ergebnissen der Autoren handelt es sich hierbei nicht um eine Schiffsche Base, sondern um ein Vinyl-amin-Derivat)⁶⁾.

Das kristallisiert in 80-proz. Ausbeute anfallende, geschützte Tripeptid [27-29 a] ließ sich mit 70-proz. Essigsäure bei 40° unter Abspaltung von Benzoylacetone in chromatographisch reinen Methionyl-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [27-29 b] überführen.

Zur Synthese des zweiten Tripeptidbruchstückes mit der Sequenz 24-26 wurde Benzyloxycarbonyl-tryptophyl-leucin-BOC-hydrazid [25-26 c] auf zwei Wegen mit identischer optischer Reinheit hergestellt. Benzyloxycarbonyl-tryptophan [25 a] und Leucin-methylester [26 d] ließen sich nach dem Carbodiimid-Verfahren zum Acyldipeptidester [25-26 a] vereinigen; das daraus nach alkalischer Verseifung erhaltene Benzyloxycarbonyl-tryptophyl-leucin [25-26 b] konnte auf analogem Wege mit BOC-Hydrazid zum Acyldipeptid-BOC-hydrazid [25-26 c] umgesetzt werden. Erfolgreicher jedoch verlief die Darstellung von [25-26 c] aus Benzyloxycarbonyl-tryptophan-*p*-nitrophenylester [25 b]⁷⁾ und Leucin-BOC-hydrazid [26 c]. Letzteres war mit guter Ausbeute aus Phthalyl-leucin [26 a] über das Phthalyl-leucin-BOC-hydrazid [26 b] zugänglich. Übliche hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe führte zum Tryptophyl-leucin-BOC-hydrazid [25-26 d], das nach der SHEEHAN-Methode mit Trifluoracetyl-glutamin [24] zum Trifluoracetyl-tripeptid-BOC-hydrazid [24-26 a] verknüpft werden konnte. Trifluoressigsäure-Solvolyse von [24-26 a] ergab Trifluoracetyl-glutaminyll-tryptophyl-leucin-hydrazid [24-26 b] in über 80-proz. Ausbeute.

Schließlich konnte Trifluoracetyl-glutaminyll-tryptophyl-leucyl-methionyl-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [24-29] durch Azidverknüpfung der beiden Tripeptid-Bruchstücke [24-26 b] und [27-29 b] gewonnen werden.

Fräulein B. BOUSCHKA, Fräulein B. SCHERER und Herrn A. UHLEMAYR danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit.

⁵⁾ E. DANE, F. DREES, P. KONRAD und T. DOCKNER, *Angew. Chem.* **74**, 873 [1962]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **1**, 658 [1962].

⁶⁾ Frau Prof. Dr. E. DANE danken wir für wichtige Hinweise.

⁷⁾ M. WILCHEK und A. PATCHORNIK, *J. org. Chemistry* **28**, 1874 [1963].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Unter experimenteller Mitarbeit von Herrn A. VOLK, Farbwerke Hoechst AG, Pharma-Forschung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. SIEDEL

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

1. *Phthalyl-L-leucin* [26a]: 131.2 g *Leucin* und 150 g *Phthalsäureanhydrid* werden, gut vermisch, am Ölbad auf 150° erhitzt. Die erkaltete Masse behandelt man mit Äther unter Rückfluß, wobei weitgehende Lösung erfolgt, filtriert vom unumgesetzten *Leucin* ab und fällt das *Phthalyl*derivat mit Petroläther. Aus Äther/Petroläther Schmp. 120.5–121°, $[\alpha]_D^{20}$: $-23.33 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -27.40° ($c = 5$, in Äthanol). Ausb. 192.2 g (73.5%).

2. *Phthalyl-L-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [26b]: Eine Lösung von 190.7 g *Phthalyl-leucin* in 1.5 l Tetrahydrofuran wird bei -10° mit 101.5 ccm *Triäthylamin* versetzt und anschließend werden 70 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* zugetropft. Man hält 15 Min. bei -10° unter Rühren und gibt schließlich 104 g *BOC-Hydrazid* in 250 ccm Tetrahydrofuran zu. Es wird 2 Stdn. bei -10° und 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt, nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. der Rückstand zwischen Äther und Wasser verteilt, die abgetrennte Ätherphase wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und natriumchloridhaltigem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Äther/Petroläther mit Schmp. 138–138.5°; $[\alpha]_D^{20}$: $-14.34 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -16.76° ($c = 5$, in Methanol). Ausb. 180.1 g (76.4%).

$C_{19}H_{25}N_3O_5$ (375.4) Ber. C 60.79 H 6.71 N 11.19 Gef. C 60.91 H 6.87 N 11.08

3. *L-Leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [26c]: 155 g *Phthalyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* in 700 ccm Methanol werden mit 21 g *Hydrazinhydrat* 20 Stdn. bei Raumtemperatur stengelassen. Abgeschiedenes *Phthalhydrazid* wird abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und vorsichtig mit Petroläther gefällt; Schmp. 114–116°; $[\alpha]_D^{20}$: $+21.54 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+25.52^\circ$ ($c = 2.2$, in Methanol). Ausb. 97.8 g (95.4%).

$C_{11}H_{23}N_3O_3$ (245.3) Ber. C 53.85 H 9.45 N 17.12 Gef. C 53.70 H 9.61 N 17.21

4. *Benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucin-methylester* [25-26a]: 36.3 g *Leucin-methylester-hydrochlorid* [26d·HCl] in 150 ccm Dimethylformamid werden bei -10° mit 27.8 ccm *Triäthylamin* versetzt; nach 5 Min. saugt man ausgefallenes *Triäthylaminhydrochlorid* ab und vereinigt das Filtrat mit 67.6 g *Benzyloxycarbonyl-tryptophan* [25a] in 100 ccm Dimethylformamid. Unter Rühren wird bei -15° eine Lösung von 44 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 100 ccm Acetonitril zugesetzt, 1 Stde. bei -10° nachgerührt und nach 12stdg. Stehenlassen im Kühlschrank ausgefallener *Dicyclohexylharnstoff* abfiltriert. Die Essigesterlösung des nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhaltenen Öls wird wie üblich mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. zur Trockne gebracht. Der ölige Rückstand, gelöst in 100 ccm Äthanol, erstarrt auf Zusatz von 500 ccm Wasser zu einer halbfesten Masse. Sie wird nach Trocknen i. Vak. über P_2O_5 mit 100 ccm Diisopropyläther verrieben, erneut getrocknet und schließlich aus Diisopropyläther/Äthanol umkristallisiert; Schmp. 113–114°. Ausb. 66.1 g (71%).

$C_{26}H_{31}N_3O_5$ (465.5) Ber. C 67.08 H 6.71 N 9.03 Gef. C 67.16 H 6.89 N 8.99

5. *Benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucin* [25-26b]: 63.6 g *Benzyloxycarbonyl-tryptophyl-leucin-methylester* in 500 ccm Dioxan werden wie üblich mit 120 ccm *n NaOH* innerhalb

von 45 Min. verseift und nach Zugabe von 120 ccm *n* HCl aufgearbeitet. Den Rückstand nimmt man in 200 ccm *n* NaHCO₃ auf, extrahiert die Natriumsalzlösung 2mal mit 50 ccm Essigester und säuert mit 2*n* H₂SO₄ an. Farblose Kristalle aus 50-proz. Äthanol: Schmp. 144–146°. Ausb. 45.6 g (74%).

C₂₅H₂₉N₃O₅ (451.5) Ber. C 66.50 H 6.47 N 9.31 Gef. C 66.61 H 6.62 N 9.44

6. *Benzylloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [25-26c]

a) 11.87 g *Benzylloxycarbonyl-tryptophyl-leucin* [25-26b] und 3.50 g *BOC-Hydrazid* in 50 ccm Acetonitril und 50 ccm Dimethylformamid werden bei –20° mit 5.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 25 ccm Acetonitril versetzt, 1 Stde. bei –20° gerührt und 12 Stdn. im Kühlschrank stehengelassen. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur wird vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Die Essigesterlösung des erhaltenen Öls wird mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand kristallisiert nach Versetzen mit 150 ccm absol. Äther und Stehenlassen im Kühlschrank. Aus Essigester farblose Nadeln, Schmp. 121–123°. Ausb. 8.10 g (54%). (Eine Probe ergibt aus absol. Äthanol farblose lange Nadeln vom Schmp. 127–130°; $[\alpha]_D^{25}$: –39.9 ± 0.8°, *c* = 2, in Methanol.)

b) Aus *Benzylloxycarbonyl-tryptophan-[p-nitro-phenylester]* [25b] und *Leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [26c]: 2.45 g *Leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* in 25 ccm Pyridin werden bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 4.62 g *Benzylloxycarbonyl-tryptophan-[p-nitro-phenylester]*⁷⁾ in 25 ccm Pyridin versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser und dampft nach Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. ein. Das erhaltene Öl kristallisiert beim Behandeln mit heißem Diisopropyläther rasch nach Animpfen, Schmp. 130°; $[\alpha]_D^{25}$: –40.0 ± 0.8° (*c* = 2, in Methanol). Ausb. 4.65 g (83.3%, bez. auf *Leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid*).

C₃₉H₃₉N₅O₆ (565.6) Ber. C 63.70 H 6.95 N 12.38 Gef. C 63.58 H 7.20 N 12.17

7. *L-Tryptophyl-L-leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [25-26d]: 17.0 g *Benzylloxycarbonyl-tryptophyl-leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* in 150 ccm Methanol werden wie üblich in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert (Vibromischer) und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand wird über P₂O₅ bei 0.01 Torr getrocknet: amorphes Pulver. Ausb. 12.85 g (fast quantitativ).

8. *Trifluoracetyl-L-glutamin* [24]: 58.5 g *Glutamin* in 400 ccm *n* NaOH und 83 g *Trifluor-thioessigsäure-S-äthylester* werden 5 Stdn. bei 25° gerührt (Ultra-Turrax). Nicht umgesetztes SCHALLENBERG-CALVIN-Reagenz wird ausgeäthert, die wäßr. Phase mit 89 ccm 4.5*n* HCl angesäuert und mit Natriumchlorid gesättigt. Das abgeschiedene Öl wird in Essigester aufgenommen, die abgetrennte organische Phase mit natriumchloridhaltigem Wasser säurefrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingeengt. Auf Zusatz von Petroläther tritt Kristallisation ein, die im Kühlschrank vervollständigt wird; farblose Kristalle, Schmp. 152.5°. Ausb. 73.0 g (72.3%).

C₇H₉F₃N₂O₄ · 1/2 H₂O (251.2) Ber. C 33.47 H 4.01 N 11.15 Gef. C 33.5 H 4.1 N 11.2

9. *Trifluoracetyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [24-26a]: 12.77 g *Tryptophyl-leucin-BOC-hydrazid* (hergestellt unter 7.) in 30 ccm Acetonitril werden mit 8.28 g *Trifluoracetyl-glutamin* in 50 ccm Tetrahydrofuran vereinigt und bei –20° mit 6.18 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 20 ccm Acetonitril versetzt. Nach 12 Stdn.

Stehenlassen bei -3° wird die neben Dicyclohexylharnstoff abgeschiedene dicke Gallerte mit 150 ccm Dimethylformamid in Lösung gebracht (3 Stdn. Rühren bei Raumtemperatur). Das Filtrat wird nunmehr i. Vak. konzentriert, nochmals von wenig abgeschiedenem Harnstoff befreit und mit 200 ccm Wasser behandelt. Nach 4 Stdn. bei 0° wird die ausgefallene Substanz abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P_2O_5 bei 0.01 Torr getrocknet. Das Rohprodukt erwärmt man 30 Min. mit 250 ccm absol. Äthanol/Pyridin (4:1) auf 90° . Nach mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank filtriert man ab, wäscht mit Äthanol und trocknet über P_2O_5 bei 0.03 Torr; Schmp. 265° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $-26.9 \pm 0.8^{\circ}$ ($c = 2$, in Dimethylformamid). Ausb. 12.45 g (64.2%, bez. auf Tryptophyl-leucin-BOC-hydrazid).

$C_{29}H_{40}F_3N_7O_7$ (655.7) Ber. C 53.11 H 6.14 N 14.96 Gef. C 53.1 H 6.6 N 15.1

10. *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucin-hydrazid* [24-26b]: 10.0 g *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-tryptophyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* (hergestellt unter 9.) werden mit 20 ccm *Trifluoressigsäure* versetzt. Nach erfolgter Lösung und beendeter Gasentwicklung (45 Min.) wird überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. entfernt. Beim Verreiben mit 200 ccm absol. Äther wird der Rückstand fest; er wird abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen und über P_2O_5 bei 0.1 Torr getrocknet. Nach Verreiben mit Natriumhydrogencarbonatlösung, Abfiltrieren, sorgfältigem Waschen mit Wasser und Trocknen über P_2O_5 bei 0.05 Torr Schmp. $249-252^{\circ}$ (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $-23.8 \pm 0.8^{\circ}$ ($c = 2$, in Dimethylformamid). Ausb. 7.0 g (82.5%).

$C_{24}H_{32}F_3N_7O_5$ (555.6) Ber. C 51.89 H 5.80 N 17.69 Gef. C 52.30 H 6.01 N 17.40

11. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [29b]: 100 g *Benzyloxycarbonyl-threonin* [29a] in 1000 ccm Dichlormethan werden bei 0° mit 900 ccm trockenem *Isobuten* und 10 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und verschlossen 5 Tage (unter anfänglichem Schütteln) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach gießt man das stark gekühlte Gemisch in eiskalte 5-proz. Natriumcarbonatlösung und wäscht die abgetrennte Dichlormethanphase 2mal mit obiger Carbonatlösung und anschließend mit Wasser neutral. Nach Eindampfen i. Vak. hinterbleibt ein farbloses Öl, das mehrere Tage im Vakuumtrockenschrank über P_2O_5 getrocknet wird; R_F 0.74 mit n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (5:1:1). (2 Verunreinigungen unter 1% sind vermutlich die beiden Monosubstitutionsprodukte *Z-Thr(tBu)-OH* und *Z-Thr-OtBu.*) Ausb. 143 g (99%).

12. *O-tert.-Butyl-L-threonin-tert.-butylester-dibenzolsulfimid*salz [29c-Dibenzolsulfimid]salz

a) 50 g *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [29b] in 300 ccm Methanol werden, wie üblich, in Gegenwart von Palladiumschwarz entacyliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhält man *O-tert.-Butyl-threonin-tert.-butylester* [29c] als blaßgelbes Öl; R_F 0.88 mit tert.-Butylalkohol/Äthanol/Wasser (1:1:1). Ausb. 31.0 g (98.2%).

b) 30 g des Öls in 50 ccm Äther werden mit einer Lösung von 42.2 g *Dibenzolsulfimid* in 200 ccm Äther vereinigt; es erfolgt alsbald Abscheidung des kristallisierten Salzes. Farblose Nadeln vom Schmp. $82-83^{\circ}$; R_F 0.49 mit n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig/Wasser/Pyridin (25:50:6:24:20). Ausb. 57 g (83.1%).

$C_{12}H_{26}NO_3 \cdot C_{12}H_{10}NO_4S_2$ (528.7) Ber. N 5.30 S 12.13 Gef. N 5.43 S 11.90

13. *Benzyloxycarbonyl-L-asparagin-[p-nitro-phenylester]* [28b]: 184 g *Benzyloxycarbonyl-asparagin* [28a] in 1000 ccm Dimethylformamid versetzt man unter Kühlung und Rühren mit 115.8 g *p-Nitro-phenol*, fügt bei 0° 143 g *Dicyclohexylcarbodiimid* allmählich zu, läßt 1 Stde. bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Aus der vom Dicyclohexylharnstoff befreiten Lösung kristallisiert der *Nitrophenylester* auf Zugabe von Wasser im

Kühlschrank aus. Aus Dimethylformamid/Wasser Schmp. 153–154°; $[\alpha]_D^{20}$: $-34.6 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -41.8° ($c = 2$, in Dimethylformamid); R_F 0.90 mit Methyläthylketon/Pyridin/Wasser (2:1:2). Ausb. 160 g (60%).

14. *Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [28-29a]: 47.5 g (90 mMol) *O-tert.-Butyl-threonin-tert.-butylester-dibenzolsulfimidsalz* (hergestellt unter 12.) und 34.8 g (90 mMol) *Benzyloxycarbonyl-asparagin-[p-nitro-phenylester]* (hergestellt unter 13.) in 135 ccm Pyridin läßt man nach Zugabe von 12.5 ccm (90 mMol) *Triäthylamin* 2 Tage bei Raumtemperatur stehen. Das Filtrat vom ausgefallenen Dibenzolsulfimidsalz des Triäthylamins wird bei 35° Wasserbadtemperatur i. Vak. eingeengt, die Lösung des erhaltenen Öls in 500 ccm Benzol mit verd. Citronensäurelösung und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingeengt. Der verbleibende feste Rückstand wird aus Benzol/Petroläther umkristallisiert; farblose Nadeln vom Schmp. 120–121°; $[\alpha]_D^{20}$: $-8.96 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -9.61° ($c = 1$, in Methanol). Ausb. 38.8 g (90.0%).

$C_{24}H_{37}N_3O_7$ (479.6) Ber. N 8.76 Gef. N 8.79

15. *L-Asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [28-29b]: 39.5 g *Benzylcarbonyl-asparaginyll-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [28-29a] in Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydrogenolytisch entacyliert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand kristallisiert aus Äthanol/Äther/Petroläther in farblosen, verfilzten Nadeln vom Schmp. 150–150.5°; $[\alpha]_D^{20}$: $+3.0^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+3.3 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.8$, in Dimethylformamid) (Lit.²⁾ Schmp. 149°; $[\alpha]_D^{21}$: $+3.0^\circ$, $c = 1.27$, in Dimethylformamid); R_F 0.83 mit tert.-Butylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30), Ausb. 28.1 g (99%).

$C_{16}H_{31}N_3O_5$ (345.4) Ber. N 12.16 Gef. N 12.19

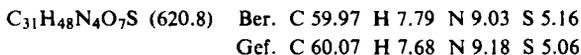
16. *Kaliumsalz von [1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionin* [27a-Kaliumsalz]*): In einer Lösung von 6.57 g *Benzoylacetone* (40.5 mMol) in 100 ccm absol. Äthanol und 20 ccm 2.025*n* methanol. *KOH* (40.5 mVal) werden 6.04 g *L-Methionin* (40.5 mMol) suspendiert. Das Reaktionsgemisch erhitzt man unter Rückfluß auf dem Wasserbad, bis die Aminosäure vollständig in Lösung gegangen ist. Beim Abkühlen der Lösung kristallisiert das *N*-geschützte Methioninkalium in feinen farblosen Nadeln aus. Das abfiltrierte Produkt wäscht man mit wenig kaltem absol. Äthanol, anschließend mit absol. Äther (1. Frakt., 11.3 g). Aus der Mutterlauge erhält man nach Einengen i. Vak. eine 2. Fraktion, die aus absol. Äthanol umkristallisiert wird (0.9 g); Schmp. 225° (Zers.). Ausb. 12.2 g (91%).

Spaltung zu L-Methionin: Eine Probe *[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-methionin-kalium* wird bei 40° mit 70-proz. *Essigsäure* 4 Stdn. behandelt. Vom ausgefallenen *Benzoylacetone* wird abfiltriert, das Filtrat mehrfach mit Äther ausgeschüttelt und die wäbr. Phase i. Vak. eingeengt. Nach zweimaligem Umfällen des Rückstandes aus Wasser/Äthanol isoliert man chromat. reines *Methionin*. $[\alpha]_D^{20}$: $+23.01 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+27.33^\circ$ ($c = 1.97$, in 5*n* HCl). Ausgangsmaterial: $[\alpha]_D^{20}$: $+22.8$ ($c = 2$, in 5*n* HCl).

17. *[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-L-methionyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [27-29a]: Zu 9.95 g *Kaliumsalz von [1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-methionin* (30 mMol) in 100 ccm Tetrahydrofuran und 10 ccm Dimethylformamid werden bei -10° 2.86 g *Chlorameisensäure-äthylester* (30 mMol) in 10 ccm Tetrahydrofuran getropft. Nach 1½ stdg. Rühren gibt man langsam eine Lösung von 10 g *Asparaginyll-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [28-29b] (29 mMol) in 100 ccm Tetrahydrofuran und 20 ccm Dimethylformamid zu und rührt 5 Stdn. bei -10° sowie 24 Stdn. bei Raumtemperatur. Der nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte

*) Hergestellt nach einer, uns von Frau Prof. E. DANE freundlicherweise überlassenen, Vorschrift.

organ. Phase mit 20-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 17.5 g (97%) eines blaßgelben amorphen Pulvers vom Schmp. 160–163°. Aus absol. Äthanol farblose Nadeln, Schmp. 161.5–163°; $[\alpha]_{D}^{20}$: +78.22 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +103.59° ($c = 2$, in Äthanol). Ausb. 14.5 g (80%).



18. *L*-Methionyl-*L*-asparaginyll-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonin-*tert*-butylester [27-29b]: 9.31 g [1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-methionyl-asparaginyll-*O*-*tert*-butyl-threonin-*tert*-butylester (15 mMol) werden unter Rühren bei einer Badtemperatur von 40° in 30 ccm 70-proz. Essigsäure gelöst. Nach 48 Stdn. wird das Filtrat vom Benzoylacetone mit Wasser verdünnt, wobei sich weitere Mengen Benzoylacetone sowie etwas Ausgangsmaterial abscheiden. Die filtrierte wäbr. Lösung wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Natriumcarbonatlösung auf pH 8 gestellt und das abgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen. Die organische Phase wäscht man mit wenig Natriumchlorid-gesättigtem Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. ein. Man erhält 6.0 g eines festen, farblosen Schaumes, der zur Reinigung in Äther aufgenommen und mit Petroläther wieder ausgefällt wird. Das erhaltene Öl geht beim Trocknen i. Hochvak. bei Raumtemperatur in eine amorphe Masse über, die sich nur schwer von Lösungsmittelresten befreien läßt. $[\alpha]_{D}^{20}$: -7.46 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -9.36° ($c = 2$, in Äthanol).



19. Trifluoracetyl-*L*-methionin [27b]: 60.0 g Methionin in 400 ccm *n* NaOH werden mit 83 g Trifluorthioessigsäure-*S*-äthylester, wie für Trifluoracetyl-glutamin unter 8. beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet; farblose Kristalle vom Schmp. 65°, Ausb. 77.2 g (78.8%).



20. Trifluoracetyl-*L*-methionin-*tert*-butyloxycarbonylhydrazid [27c]: 49.0 g Trifluoracetyl-methionin [27b] und 26.4 g BOC-Hydrazid in 175 ccm Dimethylformamid und 140 ccm Acetonitril werden bei -20° mit 42 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt, 2 Stdn. bei dieser Temperatur gerührt und über Nacht bei -5° stengelassen. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft; als Rückstand verbleibt ein Öl, dessen Essigesterlösung bei 0° wie üblich mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet wird. Nach Einengen i. Vak. erhält man ein Öl, das aus Äthanol/Wasser beim Aufbewahren im Kühlschrank kristallisiert, Schmp. 75°. (Das Rohprodukt ist ohne weitere Reinigung für die folgende Umsetzung geeignet.) Ausb. 54.0 g (75%).

21. Trifluoracetyl-*L*-methionin-hydrazid [27d]: 54.0 g rohes Trifluoracetyl-methionin-BOC-hydrazid [27c] werden mit 450 ccm 0.8 *n* HCl/Essigester 5 Stdn. bei 45° behandelt. Trifluoracetyl-methionin-hydrazid-hydrochlorid scheidet sich als dicke voluminöse Masse ab; es wird nach mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank abfiltriert und mit Essigester und absol. Äther gewaschen. Nach Trocknen über KOH bei 0.1 Torr erhält man 29.0 g (65%, bez. auf rohes Trifluoracetyl-methionin-BOC-hydrazid) hellbeiges, amorphes Pulver; Schmp. (159–161) 164° (Zers.).

Die Lösung von 24.0 g des Hydrochlorids in 50 ccm Wasser wird nach Entfärbung mit Tierkohle mit festem Kaliumhydrogencarbonat gesättigt. Nach 2stdg. Aufbewahren im Kühlschrank filtriert man den Niederschlag ab, wäscht mit wenig Eiswasser und trocknet über P₂O₅ bei 0.03 Torr; farblose Kristalle vom Schmp. 116°; $[\alpha]_{D}^{20}$: -17.6 ± 0.8° ($c = 2$, in Methanol); Ausb. 17.1 g (54.3%, bez. auf rohes Trifluoracetyl-methionin-BOC-hydrazid).



22. *Trifluoracetyl-L-methionyl-L-asparaginylo-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [27-29c]: 13.0 g *Trifluoracetyl-methionin-hydrazid* [27d] in 110 ccm *n* HCl werden mit 125 ccm Essigester überschichtet und bei -5° tropfenweise unter Rühren mit 3.50 g *Natriumnitrit* in 50 ccm Wasser versetzt. Nach 5 Min. wird die Essigesterphase abgetrennt, 2mal mit wenig Eiswasser geschüttelt und kurz über MgSO_4 bei 0° getrocknet. Die *Azid-Lösung* filtriert man in eine auf -10° gekühlte Suspension von 17.25 g *Asparaginylo-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* (hergestellt unter 15.) in 375 ccm Essigester und läßt 48 Stdn. bei -5° stehen. Danach wäscht man die Essigesterreaktionslösung wie üblich mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. ein. Das erhaltene zähe, gelbliche Öl wird in 30 ccm heißem Äthanol gelöst und mit 200 ccm Wasser versetzt. Nach Animpfen tritt alsbald Kristallisation ein, die durch mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständig wird; farblose Kristallnadeln vom Schmp. 124° ; $[\alpha]_D^{24}$: $-21.9 \pm 0.8^{\circ}$ ($c = 2$, in Methanol). Ausb. 10.3 g (36%, bez. auf eingesetzten Dipeptidester).

$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ (572.6) Ber. N 9.78 S 5.60 Gef. N 9.5 S 5.8

23. *Trifluoracetyl-L-glutaminylo-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginylo-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [24-29]: 2.77 g (5.00 mMol) *Trifluoracetyl-glutaminylo-tryptophyl-leucin-hydrazid* (hergestellt unter 10.) in 10 ccm Dimethylformamid und 10 ccm *2n* HCl werden bei -5° tropfenweise mit einer Lösung von 0.345 g *Natriumnitrit* in 3 ccm Wasser und 100 ccm vorgekühltem Essigester unter Schütteln versetzt. Darauf wird auf -25° gekühlt und die Essigester- von der gefrorenen wäbr. Phase dekantiert. Die *Azid-Lösung* wird mit eiskalter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser säurefrei gewaschen, bei 0° kurz über Natriumsulfat getrocknet und mit 2.62 g *Methionyl-asparaginylo-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* (5.5 mMol) in 25 ccm Dimethylformamid bei -10° vereinigt. Das Reaktionsgemisch bleibt 48 Stdn. bei -6° stehen; danach wird die ausgeschiedene dicke Gallerte abgenutscht, mit Essigester und Wasser gewaschen und über P_2O_5 bei $45^{\circ}/0.03$ Torr getrocknet; hellbeiges, horniges Pulver vom Schmp. $231-234^{\circ}$ (Zers.); $[\alpha]_D^{24}$: -16.4° ($c = 1$, in Dimethylformamid); Ausb. 3.40 g (68%).

$\text{C}_{45}\text{H}_{68}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_{11}\text{S}$ (1000.1) Ber. C 54.04 H 6.85 N 12.61 S 3.20
Gef. C 54.0 H 7.2 N 12.6 S 3.2