

Erich Wünsch und Fritz Drees

Zur Synthese des Glucagons, X<sup>1a)</sup>

## Darstellung der Sequenz 22–29

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

(Eingegangen am 25. Juni 1965)

■  
*N*-Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyll-L-methionyll-L-asparaginyll-*O*-tert.-butyll-L-threonin-tert.-butylester, die geschützte Teilsequenz 22–29 des Glucagons, wird auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert.

■  
Ausgehend von dem früher beschriebenen *N*<sup>α</sup>-Trifluoracetyl-glutaminyll-tryptophyll-leucyll-methionyll-asparaginyll-*O*-tert.-butyll-threonin-tert.-butylester<sup>1b)</sup> hofften wir, ein höheres Bruchstück des Glucagons mit der carboxylendständigen Sequenz aufbauen zu können. Es gelang uns jedoch nicht, eine einwandfreie Abspaltung der *N*-Trifluoracetylgruppe am Glutaminyllrest zu erzielen; trotz vielfacher Variation der Spaltungsbedingungen erhielten wir stets ein Gemisch mehrerer Peptid-Derivate. Neben dem gewünschten aminofreien Hexapeptidester konnten wir chromatographisch Produkte isolieren, die teils ninhydrin-negativ reagierten, teils nur die Hälfte oder keinen Amidstickstoff aufwiesen. In den Hydrolysaten fanden wir ferner alle Aminosäuren in der richtigen Größenordnung auf. Daraus folgt eindeutig, daß trotz mildester Spaltungsbedingungen 1. am Asparaginrest Diacylimidbildung incl. Folgereaktion (Ringöffnung unter  $\alpha,\beta$ -Transpeptidierung) und 2. am Glutaminrest nach erfolgter Ablösung der Trifluoracetyl-Gruppe Ringschluß zum Pyrrolidon-System eintritt.

Für den weiteren Aufbau einer Glucagonsequenz 20–29 war die Verknüpfung des Hexapeptid-Derivats Glutaminyll-tryptophyll-leucyll-methionyll-asparaginyll-*O*-tert.-butyll-threonin-tert.-butylester mit Trifluoracetyl-glutaminyll-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-phenylalanyl-valin-azid (zur Darstellung des entsprechenden Hydrazids, siehe l. c.<sup>1c)</sup>) vorgesehen. Auf Grund obiger Ergebnisse mußten wir, wäre die Reindarstellung der Hexapeptidkomponente und ihre Vereinigung mit dem Trifluoracetyl-tetrapeptid zum Trifluoracetyl-decapeptidester auch gelungen, bei der dann folgenden Abspaltung der Aminoschutzgruppe wiederum mit den beobachteten Nebenreaktionen rechnen.

Im Hinblick auf unsere Planung der Glucagon-Totalsynthese haben wir daraufhin ein weiteres von uns synthetisiertes Bruchstück, Trifluoracetyl-asparagyl( $\beta$ -tert.-

<sup>1)</sup> a) IX. Mittel.: E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 105 (1966), vorstehend; b) E. Wünsch, F. Drees und J. Jentsch, ebenda **98**, 803 (1965); c) E. Wünsch, ebenda **98**, 797 (1965).

butylester)-*O*-benzyl-tyrosyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid<sup>2)</sup> auf sein Verhalten bei einer Enttrifluoracetylierung untersucht. Zu unserer Überraschung trat beim Behandeln mit 0.5–1*n* NaOH keine Abspaltung des Trifluoracetyl-Restes, sondern „Hydrolyse“ der Asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester-Gruppierung ein, wobei als Intermediärreaktion Diacylimidbildung anzunehmen sein muß. (Ähnliche Befunde sind neuerdings auch von *Schwyz*<sup>3)</sup> bzw. *Bajusz*<sup>4)</sup> veröffentlicht worden.) Erst mit 2*n* NaOH im Überschuß (mindestens 2 Äquivv.) wird zusätzlich die Aminoschutzgruppe abgespalten; Asparagyl-*O*-benzyl-tyrosyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid konnte (vermutlich als Gemisch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptide) isoliert werden.

Wir haben den ursprünglichen Synthesepfad aufgegeben und nunmehr die geschützte glucagon-carboxylendständige Octapeptidsequenz Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucyl-methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester auf zwei Wegen unter Heranziehung der früher beschriebenen Tripeptidkomponente Methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester<sup>1b)</sup> hergestellt.

### Weg A

Tryptophyl-leucyl-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [25-26d]<sup>1b)</sup> wurde mit Benzyl-oxycarbonyl-glutaminy-*[p*-nitro-phenylester] [24b]<sup>5)</sup> in Pyridin zum Benzyloxycarbonyl-tripeptid-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [24-26c] umgesetzt. Hydrogenolytische Abspaltung der Aminoschutzgruppe ergab das freie Glutaminy-tryptophyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [24-26d], das als Rohprodukt sofort mit Phthalyl-phenylalanyl-valin-azid zum Phthalyl-pentapeptid-hydrazid [22-26a] vereinigt wurde. Das als Kopfkomponente für obiges Azidverfahren benötigte Phthalyl-phenylalanyl-valin-hydrazid [22-23d] konnten wir durch Dicyclohexylcarbodiimid-Verknüpfung aus Phthalyl-phenylalanin [22b]<sup>6)</sup> und Valin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [23f] (hergestellt aus Benzyloxycarbonyl-valin [23d]<sup>7)</sup> über Benzyloxycarbonyl-valin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [23e] zu [22-23c] und anschließende Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe mittels Trifluoressigsäure in guter Ausbeute in Form des Trifluoracetats gewinnen.

Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid [22-26a] läßt sich mittels Chlorwasserstoff in Trifluoressigsäure in das Phthalyl-pentapeptid-hydrazid [22-26b] überführen, das als Hydrochlorid und Monohydrat chromatographisch und analytisch rein anfiel.

Die Verknüpfung von [22-26b] und Methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [27-29b] nach dem üblichen Azidverfahren verlief unbefriedigend; Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucyl-methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [22-29a] konnte zwar in chromatographisch und analytisch reiner Form, jedoch mit nur 31% Ausbeute als farbloses Pulver isoliert werden.

2) E. Wünsch, G. Wendlberger und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 3298 (1964).

3) R. Schwyz, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber, Helv. chim. Acta **46**, 1975 (1963).

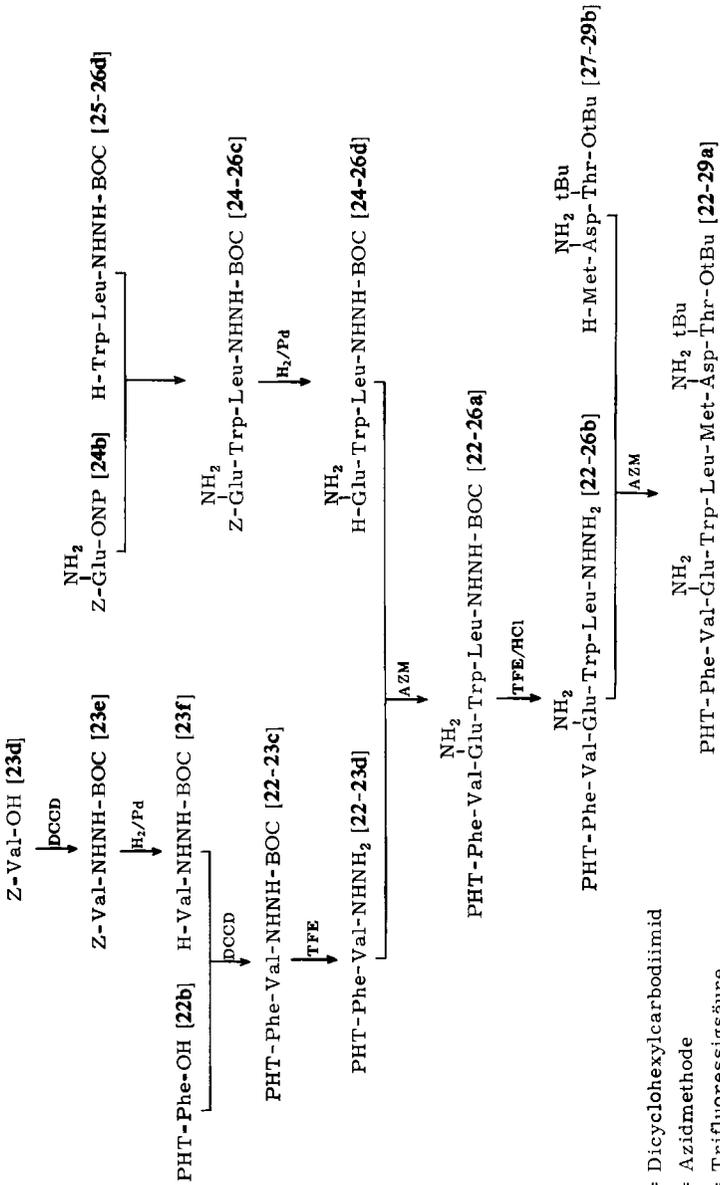
4) S. Bajusz, T. Lazar und Z. Paulay, Acta chim. Acad. Sci. hung. **41**, 329 (1964).

5) M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

6) F. Weygand und J. Kaelicke, Chem. Ber. **95**, 1038 (1962).

7) W. Graßmann und E. Wünsch, Chem. Ber. **91**, 455 (1958).

Weg A



DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid

AZM = Azidmethode

TFE = Trifluoressigsäure

Trp = Tryptophan

**Weg B**

Zur Synthese von Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucin [22-26d] haben wir einen „stufenweisen“ Aufbau vorgezogen. Leucin-tert.-butylester [26e]<sup>8)</sup> wurde mit Benzyloxycarbonyl-tryptophan [25a]<sup>9)</sup> nach dem Sheehan-Verfahren zum Benzyloxycarbonyl-dipeptidester [25-26e] verknüpft, der nach hydrogenolytischer Entfernung der Aminoschutzgruppe resultierende Dipeptidester [25-26f] mit Benzyloxycarbonyl-glutamin [24c]<sup>10)</sup> mittels der Alkylkohensäureanhydrid-Methode zu Benzyloxycarbonyl-glutaminy-tryptophyl-leucin-tert.-butylester [24-26e] umgesetzt.

Die folgende Entacylierung von [24-26e] in methanolischer Lösung mit katalytisch erregtem Wasserstoff konnte rasch und mit einwandfreien Ergebnissen bei kleineren Ansätzen vollzogen werden, bei größeren Mengen fanden wir jedoch im aufgearbeiteten Reaktionsgemisch neben dem Tripeptidester [24-26f] 2–5% ninhydrin-negatives Material, das als Pyrrolidonyl-tryptophyl-leucin-tert.-butylester identifiziert wurde. Beim Ausführen der Hydrogenolyse in Gegenwart von einem oder mehreren Äquivalenten Essigsäure erhöhte sich der prozentuale Anteil an Cyclisierungsprodukt sprunghaft auf über 30%. Ein Ausschalten dieser unerwünschten Nebenreaktionen gelang schließlich, als der während der Hydrierung anfallende freie Tripeptidester [24-26f] sofort durch Titration mittels Chlorwasserstoff in Methanol (pH 5–5.5) als Hydrochlorid abgefangen wurde.

Den Anbau von Valin an [24-26f] zum Benzyloxycarbonyl-tetrapeptidester [23-26a] vollzogen wir mit Hilfe des symmetrischen Anhydrids von Benzyloxycarbonyl-valin [23g]<sup>11)</sup>; ebenso den von Phenylalanin an den freien Valyl-glutaminy-tryptophyl-leucin-tert.-butylester [23-26b] (aus [23-26a] durch katalytische Hydrierung) mittels Phthalyl-phenylalanin-anhydrid [22c]<sup>12)</sup>. Chlorwasserstoff/Eisessig-Solvolyse des erhaltenen Phthalyl-pentapeptid-tert.-butylesters [22-26c] lieferte schließlich das reine Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucin [22-26d].

Die Verknüpfung von [22-26d] mit der Aminokomponente Methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [27-29b] nach dem Carbodiimid-Verfahren verlief zunächst unbefriedigend: Das geschützte Octapeptid-Derivat [22-29a] wurde in nur 31-proz. Ausbeute isoliert. Viel günstigere Ergebnisse (75%) konnten jedoch erzielt werden, wenn dem Reaktionsansatz *N*-Hydroxy-succinimid (mindestens 1 Äquiv., bezogen auf die Aminokomponente) zugesetzt wurde.

Diese neue Verfahrenstechnik ist generell mit gleichbleibend gutem Erfolg anwendbar; sie schließt nach unseren bisherigen Ergebnissen die Bildung der unerwünschten *N*-Acyl-harnstoffe fast vollständig aus. Ob die Reaktion über ein intermediär gebildetes *O*-Aminoacyl-*N,N*-diacyl-hydroxylamin („Succinimidoester“) verläuft oder dem *N*-Hydroxy-succinimid lediglich die Rolle des Protonlieferanten zur Protonstabilisierung des *O*-Amino-acyllactims zukommt, muß offengelassen werden.

<sup>8)</sup> R. Roeske, J. org. Chemistry **28**, 1251 (1963).

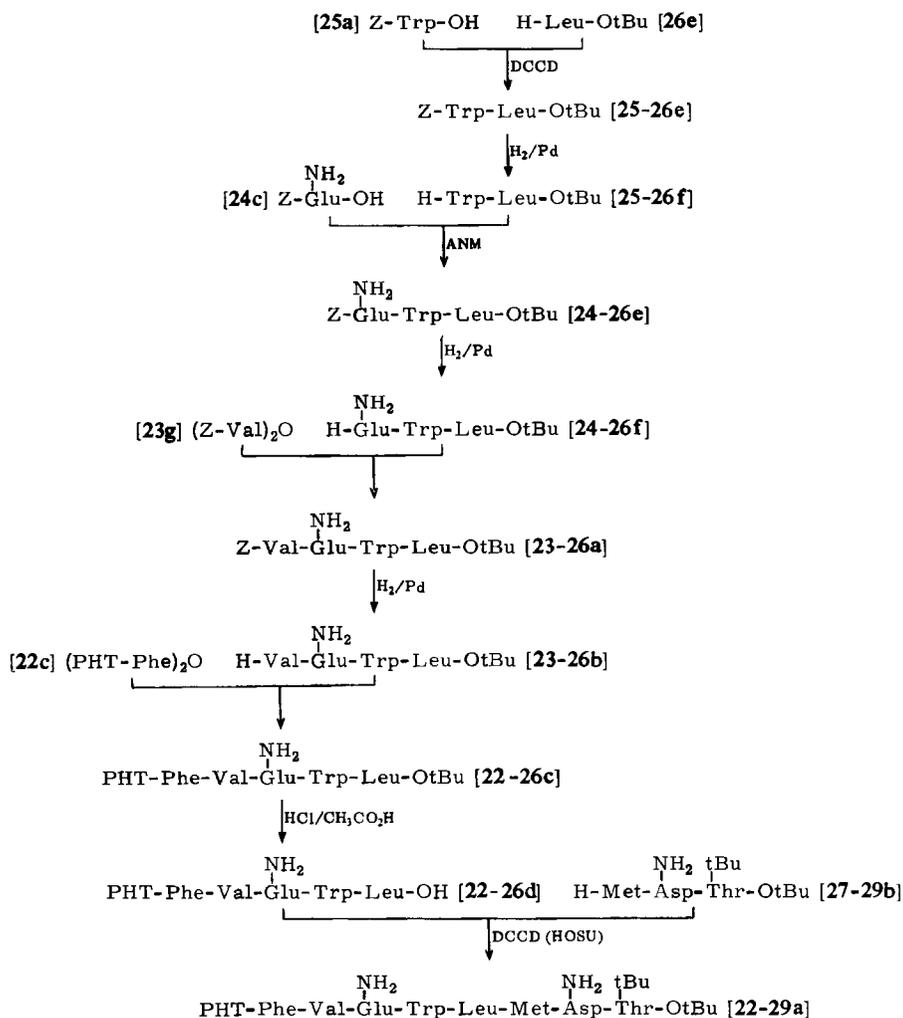
<sup>9)</sup> E. L. Smith, J. biol. Chemistry **175**, 39 (1949).

<sup>10)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **97**, 2497 (1964).

<sup>11)</sup> H. Schüssler und H. Zahn, Chem. Ber. **95**, 1076 (1962).

<sup>12)</sup> G. Tadema, E. van Harry, H. J. Pannemann und J. F. Arens, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **83**, 345 (1964).

## Weg B



ANM = Anhydridmethode

HOSU = *N*-Hydroxy-succinimid

Die nach Weg A und B gewonnenen Produkte erwiesen sich in allen Tests als einheitlich und identisch. Elementar- und Aminosäureanalysenwerte entsprachen der Forderung für einen reinen Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucyl-methionyl-asparaginy-*O*-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester [22-29a]. Die über-

einstimmenden spezifischen Drehwerte der isolierten Peptide sprechen ferner dafür, daß auf Weg B beim Verknüpfen der Carboxylgruppe des Leucins eine Racemisierung nicht oder nur in sehr geringem Maße eintritt.

Da nach den bisherigen Studien eine Dephthalylisierung von Phthalyl-asparagin- bzw. -asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester-dipeptiden mittels Hydrazinacetat bei pH 6 nach Schwyzer<sup>13)</sup> ohne Diacylimidbildung gelingt, sollte die Darstellung des freien, für einen weiteren Aufbau höherer Glucagonsequenzen notwendigen Octapeptidesters aus der Phthalylverbindung [22-29a] erfolgreich verlaufen.

Fräulein B. Bouschka und Fräulein B. Scherer danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit; Fräulein R. Scharf für die Ausführung der Aminosäureanalysen.

## Beschreibung der Versuche

Unter experimenteller Mitarbeit von Herrn A. Volk, Farbwerke Hoechst AG, Pharmaforschung, 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 Firma Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

### Weg A

1. *Phthalyl-L-phenylalanin* [22b]: Eine Lösung von 33.0 g *L-Phenylalanin* und 23.0 g Natriumcarbonat in 200 ccm Wasser wird mit 50.0 g *N-Äthoxycarbonyl-phthalimid*<sup>14)</sup> versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stdn. wird von wenig Ungelöstem abfiltriert, mit 20-proz. Salzsäure angesäuert, der gebildete Niederschlag nach 2 stdg. Stehenlassen bei 0° abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen. Nach Trocknen bei 80°/0.03 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> farblose Kristalle, Schmp. 185° (Lit.<sup>6)</sup>: 182–183°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-213 \pm 1^\circ$  ( $c = 1.9$ , in Äthanol); Ausb. 50.3 g (85%).

2. *Benzylloxycarbonyl-L-valin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [23e]: 37.8 g *Benzylloxycarbonyl-valin*<sup>7)</sup> [23d] und 20.0 g *tert.-Butylloxycarbonylhydrazid* in 300 ccm Acetonitril/Dimethylformamid (2:1) werden bei  $-20^\circ$  mit 31.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 175 ccm Acetonitril versetzt, 1 Stde. bei  $-20^\circ$  gerührt und 12 Stdn. im Kühlschrank stengelassen. Das Filtrat vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen, die erhaltene Lösung wie üblich mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die filtrierte Lösung des verbleibenden Öls in 150 ccm siedendem absol. Äthanol überläßt man nach Zugabe von 800 ccm Diisopropyläther im Kühlschrank der Kristallisation. Nach 12 Stdn. wird abfiltriert und zweimal mit 50 ccm Diisopropyläther gewaschen: feine farblose Kristalle, Schmp. 145°,  $[\alpha]_D^{23}$ :  $-45.45 \pm 0.50^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol); Ausb. 47.3 g (86%).

C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (365.4) Ber. C 59.16 H 7.45 N 11.50 Gef. C 60.0 H 7.8 N 11.9

3. *L-Valin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [23f]: 24.3 g *Benzylloxycarbonyl-valin-tert.-butylloxycarbonylhydrazid* [23e] in 250 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert. Nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. hinterbleibt ein Öl, es wird in

<sup>13)</sup> R. Schwyzer, A. Costopanagiotis und P. Sieber, Helv. chim. Acta 46, 870 (1963).

<sup>14)</sup> G. H. L. Nefkens, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 79, 688 (1960).

150 ccm Diisopropyläther aufgenommen und nach Zugabe von 200 ccm Petroläther mehrere Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt. Die entstandenen farblosen Kristalle werden abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und bei 0.05 Torr über  $P_2O_5$  getrocknet: Schmp. 105–108°, Ausb. 13.65 g (88.5%).

4. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [22-23c]: 29.5 g *Phthalyl-phenylalanin* [22b] und 23.0 g *Valin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [23f] in 500 ccm Acetonitril und 550 ccm Dimethylformamid werden bei  $-20^\circ$  mit 22.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 250 ccm Acetonitril versetzt, 1 Stde. bei  $-20^\circ$  gerührt und 48 Stdn. im Kühlschrank stehengelassen. Danach wird vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft und das verbleibende Öl in 250 ccm Essigester gelöst. Es tritt alsbald Kristallisation ein, die nach Zugabe von 250 ccm Diisopropyläther und mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt wird. Aus 400 ccm absol. Äthanol/Diisopropyläther (1:1) farblose Kristalle, Schmp. 223°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-114 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol). Ausb. 44.25 g (87%).

$C_{27}H_{32}N_4O_6$  (508.6) Ber. C 63.76 H 6.34 N 11.02 Gef. C 63.9 H 6.5 N 10.9

5. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valin-hydrazid-trifluoressigsäure* [22-23d-Trifluoroacetat]: 40.65 g *Phthalyl-phenylalanyl-valin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [22-23c] werden mit 38 ccm vorgekühlter *Trifluoressigsäure* übergossen. Nach 45 Min. im Eisbad und 1stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur (wobei zunächst Lösung, dann Abscheidung von Kristallen eintritt) wird mit 150 ccm absol. Äther versetzt, der Niederschlag nach 2stdg. Aufbewahren im Kühlschrank abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen, über  $P_2O_5$  bei 0.05 Torr getrocknet und in 100 ccm heißem Essigester und 15 ccm absol. Äthanol gelöst. Nach 4stdg. Stehenlassen im Kühlschrank filtriert man die abgeschiedenen farblosen Kristalle ab. Nach Trocknen über  $P_2O_5$  bei 0.03 Torr Schmp. 146°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-84.7 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol). Ausb. 36.3 g (89%).

$C_{22}H_{25}N_4O_4[CF_3CO_2]$  (522.5) Ber. C 55.16 H 4.82 N 10.73 Gef. C 54.7 H 5.0 N 10.9

6. *Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [24-26c]: 12.15 g *Tryptophyll-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid*<sup>1b)</sup> [25-26d] in 30 ccm absol. Pyridin werden bei  $0^\circ$  mit einer Lösung von 11.78 g (5% Überschuß) *Benzyloxycarbonyl-glutamin-(p-nitro-phenylester)*<sup>5)</sup> [24b] in 50 ccm absol. Pyridin versetzt und 20 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. resultiert ein zähes Öl, das mit 300 ccm Essigester verrieben wird. Nach mehrstdg. Aufbewahren im Kühlschrank saugt man das voluminöse Produkt ab. Es wird in 50 ccm Dimethylformamid aufgenommen und die filtrierte Lösung nach Zugabe von 100 ccm Wasser 12 Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten farblosen Kristalle werden abfiltriert, mit eiskaltem wäbr. Dimethylformamid und schließlich mit Wasser gewaschen und über  $P_2O_5$  bei 0.05 Torr getrocknet. Schmp. 247° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-28.1 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Dimethylformamid). Ausb. 13.67 g (70%).

$C_{35}H_{47}N_7O_8$  (693.8) Ber. C 60.59 H 6.82 N 14.13 Gef. C 60.5 H 6.9 N 14.6

7. *L-Glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [24-26d]: 34.0 g *Benzyloxycarbonyl-glutaminyll-tryptophyll-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [24-26c] in 160 ccm Dimethylformamid und 200 ccm Methanol (warm gelöst) werden wie üblich hydriert. Nach 5 Stdn. wird das Filtrat i. Vak. eingedampft; es hinterbleibt ein dickes Öl, das mit 250 ccm absol. Äther verrieben wird. Nach 12stdg. Stehenlassen im Kühlschrank wird abfiltriert. Nach Trocknen über  $P_2O_5$  bei 0.05 Torr amorphes Pulver vom Schmp. 105–118° (unscharf),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-31.4 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol). Ausb. 27.15 g (98%). Das chromatographisch reine Rohprodukt wird so weiter verarbeitet.

8. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [22-26a]: 7.84 g *Phthalyl-phenylalanyl-valin-hydrazid-trifluoacetat* [22-23 d-Trifluoacetat] in 30 ccm Dimethylformamid/Tetrahydrofuran (1:2) werden mit 10 ccm 4.5 n HCl versetzt, mit 30 ccm Essigester überschüttet und nach Kühlen auf  $-10^{\circ}$  tropfenweise mit 1.03 g *Natriumnitrit* in 10 ccm Wasser wie üblich umgesetzt. Nach 5 Min. wird die wäbr. Phase ausgefroren, die abgetrennte Essigesterphase unter Eiskühlung rasch mit Natriumhydrogencarbonatlösung und wenig Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die *Azid-Lösung* vereinigt man mit 5.58 g *Glutaminyll-tryptophyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [24-26d] in 40 ccm Dimethylformamid bei  $-10^{\circ}$ . Nach 12 Stdn. Stehenlassen im Kühlschrank dampft man i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in 50 ccm warmem Äthanol auf und versetzt die Lösung mit 100 ccm Wasser. Nach mehrstdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird von der halbfesten Masse dekantiert, der Rückstand in 100 ccm Äthanol heiß gelöst, wie üblich mit Aktivkohle behandelt und das Filtrat 20 Stdn. im Kühlschrank der Kristallisation überlassen. Hellbeiges mikrokristallines Pulver nach Trocknen bei 0.05 Torr über  $P_2O_5$ , Schmp.  $257^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-44.35 \pm 0.5^{\circ}$  ( $c = 2$ , in Dimethylformamid), Ausb. 5.59 g (59%).

$C_{49}H_{61}N_9O_{10} \cdot H_2O$  (954.1) Ber. C 61.68 H 6.65 N 13.21 Gef. C 62.0 H 6.9 N 13.2

<i>Aminosäureanalyse:</i>	Phe	Val	Glu	Leu
Ber.	1	1	1	1
Gef.	1.01	0.97	1.02	1.02

9. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucin-hydrazid-hydrochlorid* [22-26b-Hydrochlorid]: 1.0 g *Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminyll-tryptophyl-leucin-tert.-butyloxycarbonylhydrazid* [22-26a] wird mit 5 ccm chlorwasserstoffhaltiger *Trifluoressigsäure* (ca. 2-proz. Lösung) versetzt und 1 Stde. bei Raumtemperatur stengelassen, wobei Lösung erfolgt. Nach Eindampfen i. Vak. wird der Rückstand mit 15 ccm Methanol behandelt, das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vorsichtig abgezogen, das jetzt körnige Produkt mit 10 ccm 1 n HCl verrieben, abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und über Kaliumhydroxid bei 0.05 Torr getrocknet: fast farbloses Pulver vom Schmp.  $218-220^{\circ}$  (Zers.). Ausb. 0.74 g (78%).

$C_{44}H_{53}N_9O_8 \cdot HCl \cdot H_2O$  (890.4) Ber. N 14.2 Gef. N 14.2

10. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [22-29a]: 2.70 g *Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminyll-tryptophyl-leucin-hydrazid-hydrochlorid* (hergestellt unter 9.) in 20 ccm Dimethylformamid werden bei  $-5^{\circ}$  vorsichtig mit 5 ccm 2 n HCl versetzt, mit 40 ccm Essigester überschichtet und nach Abkühlen auf  $-10^{\circ}$  wie üblich tropfenweise mit 0.22 g *Natriumnitrit* in 3 ccm Wasser in das *Azid* übergeführt. Nach 5 Min. wird die Essigesterphase auf Zugabe von 20 ccm Wasser abgetrennt, mit Natriumhydrogencarbonatlösung und wenig Wasser gewaschen (alle Operationen bei  $0^{\circ}$ ), über Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich mit einer auf  $-10^{\circ}$  vorgekühlten Lösung von 1.0 g *Methionyl-asparaginyll-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [27-29b] in 10 ccm Essigester vereinigt. Nach 48stdg. Stehenlassen bei  $0^{\circ}$  filtriert man das ausgefallene voluminöse Produkt ab. Nach Waschen mit Essigester und Trocknen bei  $60^{\circ}$ /0.03 Torr über  $P_2O_5$  hellbeige Substanz, die mit 5 ccm absol. Äthanol ausgekocht wird: Schmp.  $222-225^{\circ}$  (Zers.). Das so erhaltene Rohprodukt wird aus 30 ccm absol. Äthanol umgefällt und wie oben getrocknet: fast farbloses Pulver vom Schmp.  $224-225^{\circ}$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-31.1 \pm 1^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Ausb. 0.82 g (31%, bez. auf eingesetzte Aminokomponente).

$C_{65}H_{89}N_{11}O_{14}S$  (1280.6) Ber. C 60.97 H 7.01 N 12.03 S 2.50  
Gef. C 60.95 H 7.25 N 12.05 S 2.60

Aminosäure-Analyse:									
	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	NH <sub>3</sub>
Ber.	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Gef.	0.98	0.96	1.04	—	1.04	1.02	1.02	0.96	2.03

**Weg B**

11. *Benzylloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butylester* [25-26e]: 196.2 g *Benzylloxycarbonyl-tryptophan* [25a], 123.0 g *Leucin-tert.-butylester-hydrochlorid* [26e]·HCl und 77 ccm *Triäthylamin* in 1.5 l *Acetonitril* werden bei  $-10^\circ$  mit 103.2 g *DCCD* versetzt und 4 Stdn. bei dieser Temperatur gerührt. Nach Stehenlassen über Nacht bei  $-5^\circ$  und anschließendem 3stdg. Rühren bei Raumtemperatur kühlt man auf  $0^\circ$ , filtriert vom *Dicyclohexylharnstoff* ab und dampft das Filtrat i. Vak. ein. Der ölige Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase wie üblich mit verd. Citronensäure-, 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das resultierende Öl wird mit Petroläther verrieben, in Äther aufgenommen und erneut i. Vak. eingedampft: Fester, farbloser Schaum,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-33.33 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-39.62^\circ$  ( $c = 1.7$ , in Methanol). Ausb. 244 g (96%).

$C_{29}H_{37}N_3O_5$  (507.6) Ber. C 68.62 H 7.35 N 8.28 Gef. C 68.50 H 7.39 N 8.32

12. *L-Tryptophyl-L-leucin-tert.-butylester-acetat* [25-26f-Acetat]: 101.5 g *Benzylloxycarbonyl-tryptophyl-leucin-tert.-butylester* [25-26e] in Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz und 13.46 ccm Eisessig wie üblich hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft und der ölige Rückstand in absol. Äther aufgenommen. Nach zweitägigem Stehenlassen bei  $0^\circ$  (rascher nach Animpfen) kristallisiert die Verbindung in farblosen Nadeln vom Schmp.  $105-107^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-18.51 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-22.15^\circ$  ( $c = 1.3$ , in Methanol). Ausb. 81 g (93%).

$C_{23}H_{35}N_3O_5$  (433.6) Ber. C 63.72 H 8.14 N 9.69 Gef. C 63.77 H 8.08 N 9.83

13. *Benzylloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butylester* [24-26e]: 42.0 g *Benzylloxycarbonyl-glutamin* [24c] und 21 ccm *Triäthylamin* in 2 l *Tetrahydrofuran* werden bei  $-15^\circ$  unter Rühren mit 14.3 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach 20 Min. bei  $-10^\circ$  wird eine Lösung von 67.2 g *Tryptophyl-leucin-tert.-butylester-acetat* [25-26f-Acetat] und 21.7 ccm *Triäthylamin* in 1 l *Tetrahydrofuran* zugegeben, 3 Stdn. bei  $0^\circ$  gerührt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Eindampfen i. Vak. behandelt man den Rückstand zur Lösung von *Triäthylammoniumchlorid* mit Wasser. Das abfiltrierte Rohprodukt wird in 1.5 l heißem Äthanol aufgenommen. Auf Zusatz von 1 l heißem Wasser tritt beim Abkühlen alsbald Kristallisation ein. Aus Äthanol/Wasser farblose Nadeln vom Schmp.  $204-205^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-42.66 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-51.94^\circ$  ( $c = 1$ , in Äthanol). Ausb. 80 g (84%).

$C_{34}H_{45}N_5O_7$  (635.8) Ber. C 64.23 H 7.13 N 11.02 Gef. C 64.15 H 7.22 N 10.77

14. *L-Glutaminyl-L-tryptophyl-L-leucin-tert.-butylester* [24-26f]: 47.7 g *Benzylloxycarbonyl-glutaminyl-tryptophyl-leucin-tert.-butylester* [24-26e] in 1.5 l Methanol werden wie üblich in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert, die entstehende freie Aminoverbindung mit Chlorwasserstoff/Methanol titriert (pH 5–5.5, Titrierautomat E 326, Methrom AG). Nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhält man einen zähen rötlichen Sirup, der nach mehrmaligem Durchreiben mit Äther/Petroläther fest wird. Die methanol. Lösung des über Kaliumhydroxid i. Vak. getrockneten Rohproduktes wird über eine *Dowex 1-X8-Säule* (OH-Form) geschickt. Nach Einengen des Filtrats i. Vak. bei Raumtemperatur erhält man ein blaßgelbes Pulver: Schmp.  $134-136^\circ$  (Sintern ab  $131^\circ$ ),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.74 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-25.69^\circ$  ( $c = 1.5$ , in Methanol). (Der chromatographisch einheitliche *Tripeptidester* wird ohne weitere Charakterisierung weiter umgesetzt.)

15. *Benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butylester* [23-26 a]: Zu 48.5 g *Glutaminyll-tryptophyll-leucin-tert.-butylester* [24-26 f] in 1 l Acetonitril gibt man unter Rühren bei Raumtemperatur 42.6 g *Benzyloxycarbonyl-valin-anhydrid* [23 g]. Nach 24 Stdn. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das gallertig ausgefallene Produkt abfiltriert, mit Äther gewaschen und aus Methanol/Wasser umkristallisiert; Schmp. 194–196°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-60.99 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-72.15^\circ$  ( $c = 1.3$ , in Methanol). Ausb. 58.2 g (90%).

$C_{39}H_{54}N_6O_8$  (734.9) Ber. C 63.74 H 7.41 N 11.44 Gef. C 63.64 H 7.53 N 11.46

16. *L-Valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butylester* [23-26 b]: 14.7 g *Benzyloxycarbonyl-valyl-glutaminyll-tryptophyll-leucin-tert.-butylester* [23-26 a] in 500 ccm Methanol werden 12 Stdn. in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft und der erhaltene blaßgelbe Rückstand über  $P_2O_5$  scharf getrocknet; Schmp. 188–189°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-44.0 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-51.23^\circ$  ( $c = 1.1$ , in Äthanol). Ausb. 11.8 g (fast quantitativ).

$C_{31}H_{48}N_6O_6$  (600.8) Ber. C 61.98 H 8.05 N 13.99 Gef. C 62.03 H 8.06 N 13.99

17. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butylester* [22-26 c]: Zu 8.6 g *Phthalyl-phenylalanin-anhydrid* [22 c] in 200 ccm Acetonitril gibt man unter magnetischem Rühren bei Raumtemperatur 9.0 g *Valyl-glutaminyll-tryptophyll-leucin-tert.-butylester* [23-26 b]. Nach 48 Stdn. Stehenlassen filtriert man von ausgefallenem gallertigen Produkt ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Rückstand und abfiltriertes Material werden gemeinsam in Essigester aufgenommen, die erhaltene Lösung mit Natriumhydrogencarbonat, verd. Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die Lösung des gelblichen Rückstands in wäßr. Äthanol wird mit Aktivkohle aufgekocht und heiß filtriert. Nach Zusatz von Wasser bis zur Trübung fällt beim Stehenlassen im Kühlschrank ein nahezu farbloses Produkt aus; Schmp. 198–200°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-83.58 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-100.8^\circ$  ( $c = 1.14$ , in Methanol). Ausb. 11.6 g (85%).

$C_{48}H_{59}N_7O_9$  (878.1) Ber. C 65.66 H 6.77 N 11.17 Gef. C 65.76 H 6.88 N 11.20

18. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin* [22-26 d]

a) 4.8 g *Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminyll-tryptophyll-leucin-tert.-butylester* [22-26 c] werden unter Stickstoffatmosphäre mit 50 ccm chlorwasserstoffgesätt. *Eisessig* übergossen. Nach 2 Stdn. Stehenlassen bei Raumtemperatur, wobei Lösung erfolgt, wird i. Vak. weitgehend eingengt, der Rückstand mit viel absol. Äther versetzt, die Fällung abfiltriert, mehrmals mit absol. Äther gewaschen und über  $P_2O_5$  und Kaliumhydroxid i. Vak. getrocknet. Aus Äthanol/Äther blaßgelbes Pulver, das sich ab 135° langsam zersetzt.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-81.12 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-98.35^\circ$  ( $c = 1.9$ , in Methanol). Ausb. 3.6 g (80%).

$C_{44}H_{51}N_7O_9$  (821.9) Ber. C 64.29 H 6.25 N 11.93 Gef. C 64.18 H 6.50 N 12.03

b) Ansatz wie unter a). Beim Umfällen aus Äthanol/Wasser wird das *Phthalyl-pentapeptid* als Hemihydrat erhalten; Schmp. 202–205°,  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-97.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol). Ausb. 3.7 g (81%).

$C_{44}H_{51}N_7O_9 \cdot 1/2 H_2O$  (830.9) Ber. C 63.60 H 6.31 N 11.80 Gef. C 63.71 H 6.25 N 11.75

19. *Phthalyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyll-L-methionyll-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [22-29 a]

a) Zur Suspension von 1.64 g *Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminyll-tryptophyll-leucin* [22-26 d] und 953 mg *Methionyll-asparaginyll-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [27-29 b] in 50 ccm Acetonitril gibt man unter Rühren bei Raumtemperatur bis zur völligen Lösung Dimethylformamid. Man kühlt auf  $-10^\circ$  ab und versetzt mit 413 mg *Dicyclohexylcarbodi-*

*imid*, rührt 1 Stde. bei  $-5^{\circ}$  und läßt 48 Stdn. in der Kühltruhe bei  $-10^{\circ}$  stehen. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der erhaltene Rückstand mit Essigester digeriert und schließlich aus Äthanol/Wasser umgefällt. Blaßgelbes Pulver vom Zers.-P.  $198-200^{\circ}$ . Bei fraktionierter Fällung aus Äthanol/Wasser erhält man als letzte Fraktion ein gelbliches Pulver: Zers.-P.  $223-224^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-34.0 \pm 2^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-42.0^{\circ}$  ( $c = 1.0$ , in Dimethylformamid), Ausb.  $0.8 \text{ g}$  (31%).

$C_{65}H_{89}N_{11}O_{14}S$  (1280.6) Ber. C 60.97 H 7.01 N 12.03 S 2.50

a) Gef. C 60.86 H 7.20 N 12.08 S 2.40

b) Gef. C 60.78 H 6.87 N 11.99 S 2.41

<i>Aminosäure-Analyse:</i>	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	$NH_3$
Ber.	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Gef.	1.00	0.99	1.00	—	1.02	1.02	0.99	0.98	2

b)  $2.49 \text{ g}$  *Phthalyl-phenylalanyl-valyl-glutaminy-tryptophyl-leucin-hemihydrat* [22-26d],  $1.43 \text{ g}$  *Methionyl-asparaginy-O-tert.-butyl-threonin-tert.-butylester* [27-29b] und  $345 \text{ mg}$  *N-Hydroxy-succinimid* in  $20 \text{ ccm}$  Dimethylformamid werden bei  $-10^{\circ}$  mit  $619 \text{ mg}$  *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Man rührt 2 Stdn. bei dieser Temperatur, läßt weitere 48 Stdn. bei  $-3^{\circ}$  stehen und filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Das auf Zusatz von  $100 \text{ ccm}$  Wasser sich abscheidende Produkt wird nach kurzer Zeit fest. Man filtriert ab, wäscht mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung,  $0.1 \text{ n}$  HCl und Wasser und trocknet über  $P_2O_5$  i. Vak., Schmp.  $225-226^{\circ}$  (Zers.).

Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt ( $3.62 \text{ g}$ ) in Chloroform/n-Butanol (3:1) aufgenommen, die erhaltene Lösung mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel i. Vak. wird der verbleibende Rückstand aus Äthanol/Wasser umgefällt: Blaßgelbes Pulver vom Schmp.  $226-227^{\circ}$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-31.8 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-39^{\circ}$  ( $c = 1.0$ , in Dimethylformamid), Ausb.  $2.90 \text{ g}$  (75%).

[296/65]