

Erich Wünsch, Anton Zwick und Gerhard Wendlberger

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

## Darstellung der Sequenz 9–23

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

(Eingegangen am 4. Mai 1966)

Die Synthese von L-Asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>5</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester, einer carboxylgeschützten Pentadecapeptid-Sequenz 9–23 des Glucagons, die sich für den Aufbau der Hormonsequenz 1–23 eignen sollte, wird beschrieben.

Mit Hilfe des von Wünsch<sup>2)</sup> erstmals aufgefundenen weitgehend racemisierungs-freien Verknüpfungsverfahrens gelang die Vereinigung des aminogeschützten Heptapeptid-Derivats Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr-Leu-Asp(OtBu)-OH [9-15]<sup>3)</sup> mit der carboxylgeschützten Octapeptid-[16-23]-Sequenz H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23b]<sup>1)</sup> zum N-Acyl-pentadecapeptidester Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [9-23a] in 88-proz. Ausbeute (s. Schema 2).

Demgegenüber erbrachte die „klassische“ Sheehan-Methode ein „Verknüpfungs-Rohprodukt“ in nur 55-proz. Ausbeute; dieses erwies sich als Gemisch von 85  $\pm$  5% Benzyloxycarbonyl-pentadecapeptidester [9-23a] und 15  $\pm$  5% N-[Benzyloxycarbonyl-heptapeptidyl]-dicyclohexylharnstoff. (Präp. Dünnschichtchromatographie sowie Stein- und Moore-Analyse der Hydrolysate.)

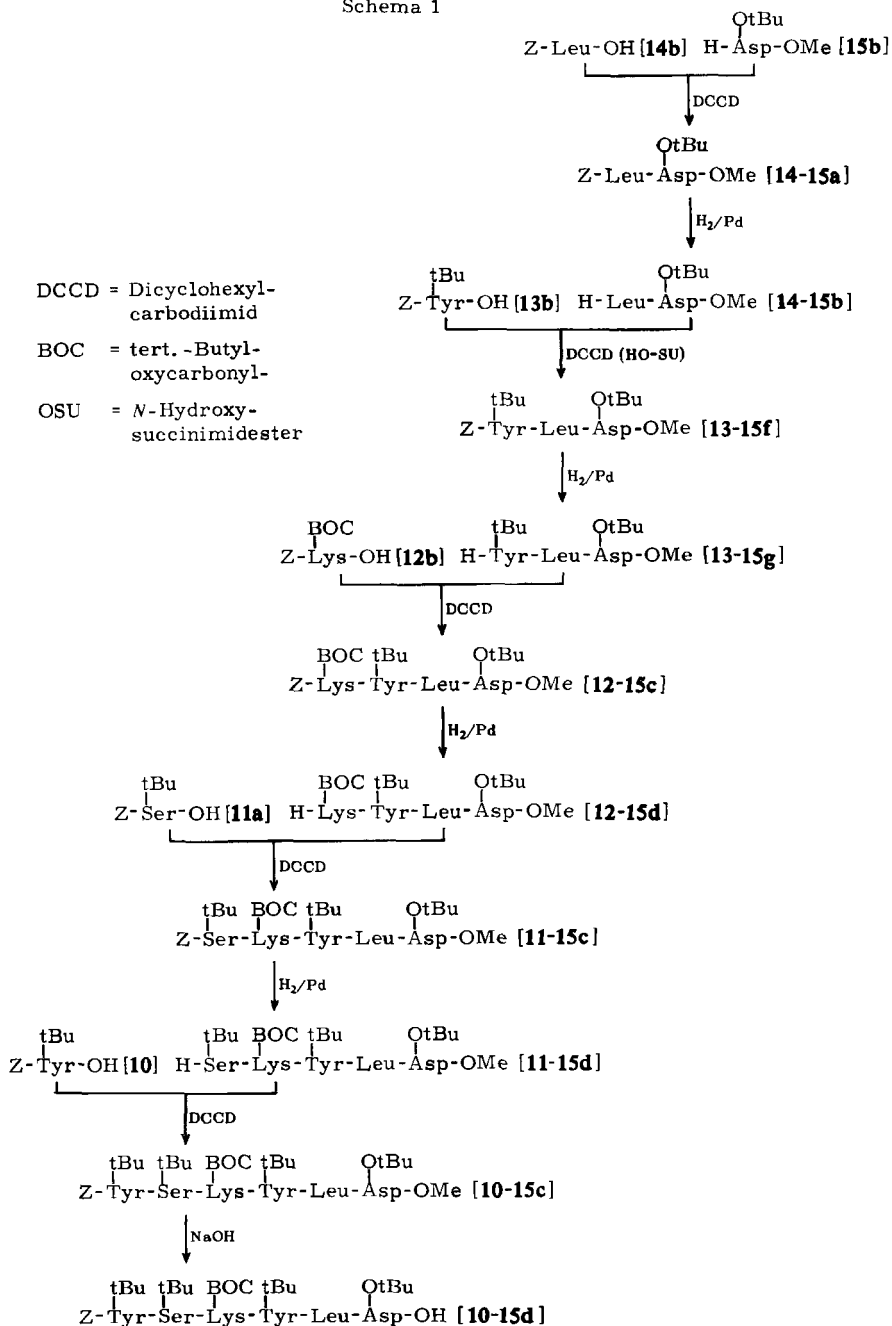
Das als Kopfkomponekte eingesetzte Benzyloxycarbonyl-heptapeptid [9-15] war zunächst am Tyrosin-[13]-Rest hydroxyl-unmaskiert. Um jedwede phenolhydroxylbedingte Störung bei den von uns noch geplanten Synthesen auszuschalten, haben wir daher das auch am Tyrosin geschützte Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [9-15b] in üblichem „stufenweisem“ Aufbau aus H-Asp(OtBu)-OMe [15b] und den entsprechenden Benzyloxycarbonyl-aminosäuren [14b], [13b], [12b], [11a], [10] und [9b] hergestellt (s. Schema 1).

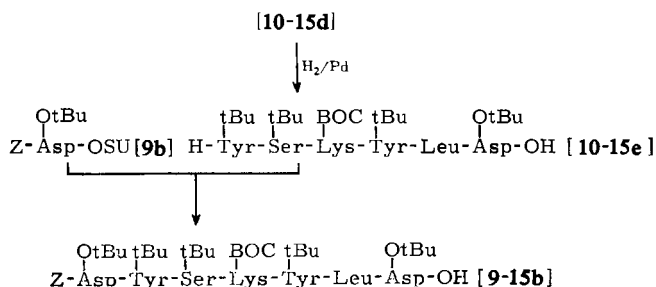
<sup>1)</sup> XI. Mitteil.: E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. 100, 160 (1967), vorstehend.

<sup>2)</sup> E. Wünsch, Patentanmeldung Farbwerke Hoechst AG 1. 3. 1966; s. ferner: E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966); F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966).

<sup>3)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 99, 105 (1966).

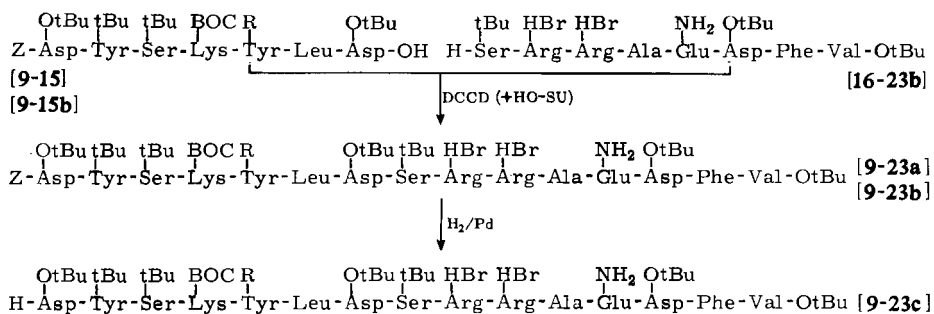
Schema 1





Die Verknüpfung des in allen dritten Funktionen maskierten Benzyloxycarbonyl-heptapeptids [9-15b] mit dem Octapeptidester [16-23b] konnte nach der eingangs erwähnten Verfahrenstechnik auch in größeren Ansätzen in hoher Ausbeute (85%) erzielt werden; die Unlöslichkeit des erhaltenen Benzyloxycarbonyl-pentadecapeptidesters [9-23b] in heißem Essigester und wässrigem Dimethylformamid erlaubte eine sichere Abtrennung unumgesetzter Ausgangskomponenten und damit die Reindarstellung von [9-23b]. Andererseits zeigte der Acylpeptidester [9-23b] noch gute Löslichkeitseigenschaften in einem Gemisch von Dimethylformamid, Methanol und wenig Wasser, so daß die hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe keinerlei Schwierigkeiten bereitete, insbesondere wenn bei 30–35° unter Einhalten eines pH-Wertes von 4 (durch Zutropfen von 0.1 n HBr) gearbeitet wurde: H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu-Hydrobromid [9-23c-Hydrobromid] konnte in quantitativer Ausbeute (als Trihydrat) chromatographisch und analytisch rein isoliert werden (s. Schema 2).

Schema 2



[9-15] und [9-23a]: R = H

[9-15b], [9-23b] und [9-23c]: R = tBu

Fräulein *B. Scherer* und den Herren *O. Kraus* und *K. Friedrich* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit, Fräulein *R. Scharf* für die Ausführung der Aminosäure-Analysen, Herrn *W. Beck* (Leiter des mikroanalytischen Laboratoriums der Abteilung) für die Ermittlung der Elementaranalysen-Werte.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter 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.

Ausgangsamino-säuren (Chem. Fabrik Fluka AG): spezif. Drehung  $100 \pm 2\%$ , Fremdaminosäuren unter  $0.05\%$  (nach Stein und Moore).

1. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [14-15a]: 198 g *H-Asp(OtBu)-OMe·HCl* [15b-Hydrochlorid]<sup>4)</sup>, 230 g *Z-Leu-OH* (Öl) [14b]<sup>5)</sup> und 115 ccm *Triäthylamin* in 1.2 l Dichlormethan werden bei  $-10^\circ$  mit 170 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt, das Reaktionsgemisch bei dieser Temp. über Nacht gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird wie üblich mit verd. Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft. Das verbleibende Öl wird in wenig absol. Äther unter Erwärmen gelöst; dabei tritt alsbald Kristallisation ein, die durch mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt wird. Farblose Nadeln aus Essigester/Äther/Petroläther: Schmp.  $95-96^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-17.8 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-21.86^\circ$  ( $c = 1.1$ ; in Äthanol). Ausb. 341 g (92%).

$C_{23}H_{34}N_2O_7$  (450.5) Ber. C 61.31 H 7.61 N 6.22 Gef. C 61.25 H 7.65 N 6.12

2. *L-Leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester-hydrochlorid* [14-15b·HCl]: 300.2 g *Z-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [14-15a] in 3 l Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert, wobei durch Zutropfen von 2*n* HCl in Methanol pH 4.5 eingehalten wird (ca. 333 ccm). Eindampfen des Filtrats i. Vak., gegen Ende unter Zusatz von absol. Benzol, hinterläßt einen festen Rückstand, der aus Äther/Petroläther in farblosen Nadeln kristallisiert: Schmp.  $154-156^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+5.0 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $+5.58^\circ$  ( $c = 2$ ; in Äthanol). Ausb. 234.8 g (fast quantitativ).

$C_{15}H_{29}N_2O_5Cl$  (352.9) Ber. C 51.06 H 8.28 Cl 10.05 N 7.94  
Gef. C 50.98 H 8.15 Cl 10.00 N 7.83

3. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [13-15f]: 185.5 g *Z-Tyr(tBu)-OH* [13b]<sup>3)</sup>, 176.5 g *H-Leu-Asp(OtBu)-OMe·HCl* [14-15b-Hydrochlorid], 60 g *N-Hydroxy-succinimid* und 70 ccm *Triäthylamin* in 1500 ccm Dimethylformamid/Acetonitril (1:1) werden bei  $-10^\circ$  mit 105 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt, die Reaktionsmischung bei dieser Temp. über Nacht gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, die Lösung des Rückstands in Essigester wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak., zum Schluß unter mehrfachem Zusatz von Toluol, eingedampft. Nach Umkristallisieren aus Diisopropylester: Schmp.  $115-116.5^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-20.9 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{346}^{20}$ :  $-24.9^\circ$  ( $c = 2.8$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in *n*-Heptan/*tert.*-Butylalkohol/Pyridin (3:1:1). Ausb. 320 g (95%).

$C_{36}H_{51}N_3O_9$  (669.8) Ber. C 64.55 H 7.67 N 6.27 Gef. C 64.18 H 7.87 N 6.25

4. *O-tert.-Butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [13-15g]: 345.0 g *Z-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [13-15f] in 2000 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert, wobei durch Zutropfen von 2*n* HCl in Methanol

<sup>4)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **333**, 108 (1963).

<sup>5)</sup> M. Bergmann, L. Zervas und J. S. Fruton, J. biol. Chemistry **115**, 593 (1963).

pH 4.5 eingehalten wird. Der nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhaltene Rückstand wird in Wasser aufgenommen, die Lösung mit Äther überschichtet und unter Eiskühlung und Schütteln mit gesätt. Natriumcarbonat-Lösung (in geringem Überschuß) versetzt. Die abgetrennte Ätherphase wäscht man mit Wasser alkalifrei, trocknet über Natriumsulfat und dampft i. Vak. bis zur Gewichtskonstanz ein. Die Ausb. an öliger Substanz ist nahezu quantitativ.

5. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [12-15c]: 190 g *Z-Lys(BOC)-OH* [12b]<sup>6)</sup> und 270 g *H-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [13-15g] (nach 4. erhaltenes Öl) in 2500 ccm Dichlormethan/Dimethylformamid (3:2) werden bei  $-10^{\circ}$  mit 110 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 Stdn. bei  $-10^{\circ}$  und anschließend 12 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand zweimal aus Äthanol umkristallisiert: Schmp.  $164.5-165^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-25.82 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{540}^{20}$ :  $-33.52^{\circ}$  ( $c = 2$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (5:1:1). Ausb. 419 g (93%).

$C_{47}H_{71}N_5O_{12}$  (898.1) Ber. C 62.85 H 7.97 N 7.80 Gef. C 62.56 H 8.19 N 7.79

6. *N<sup>ε</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [12-15d]: 98.8 g *Z-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [12-15c] in 600 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert, durch Zutropfen von 2n HCl in Methanol wird pH 4.5 eingehalten. Der nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhaltene ölige Rückstand wird mit Essigester und eiskalter Natriumcarbonat-Lösung (etwas mehr als die berechnete Menge) behandelt, die abgetrennte Essigesterphase mit Wasser alkalifrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus der ätherischen Lösung fällt der Tetrapeptidester auf Zusatz von Petroläther aus; er wird aus Diisopropyläther umkristallisiert: Schmp.  $67^{\circ}$  ( $58^{\circ}$ );  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-10.56 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{540}^{20}$ :  $-13.13^{\circ}$  ( $c = 2$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (5:1:1). Ausb. 82.9 g (96%).

$C_{39}H_{65}N_5O_{10} + 1 H_2O$  (782.0) Ber. C 59.90 H 8.64 N 8.96 Gef. C 60.03 H 8.51 N 8.91

7. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [11-15c]: 32.5 g *Z-Ser(tBu)-OH* [11a] und 80.4 g *H-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe + H\_2O* [12-15d] in 660 ccm Dichlormethan/Dimethylformamid (10:1) werden bei  $-10^{\circ}$  mit 22.7 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt; das Reaktionsgemisch wird 2 Stdn. bei dieser Temp. und anschließend 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. weitgehend eingedampft; auf Zusatz von Wasser tritt Fällung ein. Der Niederschlag wird abfiltriert und zweimal aus Methanol umkristallisiert: Schmp.  $188.5-189.5^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.6 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{540}^{20}$ :  $-24.7^{\circ}$  ( $c = 1.1$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (5:1:1) bzw. (7:1:1). Ausb. 105.8 g (91%).

$C_{54}H_{84}N_6O_{14}$  (1041.3) Ber. C 62.28 H 8.13 N 8.07 Gef. C 61.91 H 7.89 N 8.03

8. *O-tert.-Butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [11-15d]: 101 g *Z-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [11-15c], suspendiert in 1200 ccm Methanol, werden in Gegenwart von 7 ccm Essigsäure und Palladiumschwarz bei  $30^{\circ}$  wie üblich hydriert. Der nach Einengen des Filtrats i. Vak. erhaltene Rückstand wird in Essigester und Kaliumhydrogencarbonat-Lösung (im Überschuß) behandelt, die abgetrennte Essigesterphase über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Das Rohprodukt wird zweimal aus Essigester/

<sup>6)</sup> E. Wünsch und A. Trinkl, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 193 (1966).

Äther umkristallisiert: Schmp. 138—140°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-28.22 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-33.6^\circ$  ( $c = 13.3$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (7:1:1). Ausb. 86.5 g (fast quantitativ).

$C_{46}H_{78}N_6O_{12}$  (907.2) Ber. C 60.90 H 8.67 N 9.27 Gef. C 60.51 H 8.57 N 9.16

9. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure(β-tert.-butylester)-methylester* [10-15c]: 34.1 g *Z-Tyr(tBu)-OH* [10] und 83.2 g *H-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [11-15d] in 750 ccm Dimethylformamid werden mit 20.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt; die Reaktionsmischung wird 2 Stdn. bei  $-10^\circ$  und anschließend 4 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff dampft man i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand wird aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert: Schmp. 205—206.5°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.5 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-23.7^\circ$  ( $c = 1.2$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (7:1:1) bzw. (5:1:1). Ausb. 104.7 g (90%).

$C_{67}H_{101}N_7O_{16}$  (1260.6) Ber. C 63.84 H 8.08 N 7.78 Gef. C 63.68 H 7.96 N 7.69

10. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [10-15d]: 92 g *Z-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OMe* [10-15c] in 500 ccm Dioxan/Wasser (9:1) werden mit 73 ccm *n NaOH* innerhalb von 5 Stdn. wie üblich verseift (Thymolphthalein als Indikator). Beim Ansäuern der Lösung mit 70 ccm *n HCl* und 5 ccm 5-proz. Citronensäure-Lösung tritt Fällung ein, die durch kurzzeitiges Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt wird. Das abfiltrierte und i. Vak. getrocknete Material wird in Essigester aufgenommen; der auf Zusatz von 31 g Dicyclohexylamin gebildete Niederschlag wird abfiltriert und aus Acetonitril umkristallisiert: Schmp. 199—200° (Zers.). Ausb. 87.5 g.

Die Suspension des erhaltenen Dicyclohexylammoniumsalzes (87.5 g) in 1500 ccm Essigester wird mit überschüss. 10-proz. Citronensäure-Lösung unter Eiskühlung bis zur Lösung geschüttelt. Die abgetrennte Essigesterphase wird mit wenig Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. zur Trockne gebracht. Nach Umkristallisieren aus Methanol Schmp. 200—201° (Zers.). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. in Amylalkohol/Isopropylalkohol/Wasser (100:40:55). Ausb. 75 g (83%).

$C_{66}H_{99}N_7O_{16}$  (1246.6) Ber. C 63.49 H 8.10 N 7.87 Gef. C 63.15 H 8.18 N 8.06

11. *O-tert.-Butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [10-15e]: 54.9 g *Z-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [10-15d] in 2000 ccm Methanol werden in Gegenwart von 10 ccm Eisessig und Palladiumschwarz wie üblich hydriert, wobei das freie Hexapeptid ausfällt. Der Filtrückstand wird mit 1000 ccm Dimethylformamid auf dem siedenden Wasserbad behandelt; aus dem Filtrat (vom Katalysator!) scheidet sich beim Stehenlassen im Kühlschrank das Hexapeptid ab. Es wird abfiltriert und i. Vak. bei  $10^{-3}$  Torr getrocknet:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+16.44 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+19.33^\circ$  ( $c = 1.1$ ; in Essigsäure). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30), n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2), n-Propanol/Essigester/Wasser (4:3:3) und n-Heptan/Pyridin/Wasser (3:1:1). Ausb. 46.9 g (96%).

$C_{58}H_{93}N_7O_{14}$  (1112.4) Ber. C 62.63 H 8.43 N 8.82 Gef. C 62.56 H 8.48 N 9.01

12. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [9-15b]: 40.5 g *H-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [10-15e] und 5.06 ccm *Triäthylamin* in 600 ccm Dimethylformamid werden mit 18.4 g

*Z-Asp(OtBu)-OSU [9b]*<sup>3)</sup> in 100 ccm Dioxan versetzt; das Reaktionsgemisch wird 1 Stde. bei 30° gerührt, wobei der pH-Wert der Lösung von 8.5 auf 7 abfällt. Nach Eindampfen i. Vak. wird der verbleibende Rückstand mit 5-proz. Citronensäure-Lösung (im Überschuß) unter Eiskühlung behandelt; das abfiltrierte und i. Vak. getrocknete Material wird aus Acetonitril umkristallisiert: Schmp. 198–200°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-17.9 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-21.6^\circ$  ( $c = 1.3$ ; in Äthanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. n-Propanol/Essigester/Wasser (4:3:3) bzw. n-Heptan/Pyridin/Wasser (3:1:1). Ausb. 48.0 g (93%).

$C_{74}H_{112}N_8O_{19}$  (1417.8) Ber. C 62.69 H 7.96 N 7.90 Gef. C 62.65 H 7.95 N 7.89

13. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [9-23a]*: 600 mg *Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr-Leu-Asp(OtBu)-OH [9-15]*<sup>3)</sup>, 600 mg *H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23b]*<sup>1)</sup> und 60 mg *N-Hydroxy-succinimid* in 10 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^\circ$  mit 100 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stdn. bei  $-5^\circ$ , nach Zusatz von 15 ccm Dimethylformamid 24 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und schließlich auf  $-10^\circ$  abgekühlt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand nacheinander mit Äther, Essigester und Wasser digeriert. Nach Umfällen aus Dimethylformamid/Wasser (1:1) Schmp. 230°. Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. n-Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2) bzw. Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 970 mg (88%).

$C_{123}H_{195}N_{23}O_{31}Br_2$  (2651.9) Ber. C 55.71 H 7.41 Br 6.03 N 12.15  
Gef. C 56.01 H 7.60 Br 5.66 N 11.86

14. *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [9-23b]*: 46.25 g *Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [9-15b]*, 43.0 g *H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23b]* und 5.0 g *N-Hydroxy-succinimid* in 600 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^\circ$  mit 8.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt; die Reaktionsmischung wird 30 Stdn. bei  $-5^\circ$ , anschließend 40 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und schließlich auf  $-15^\circ$  abgekühlt. Das Filtrat vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff engt man i. Vak. auf ein kleines Vol. ein; beim Einrühren in heißen Essigester resultiert ein flockiger Niederschlag. Dieser wird abfiltriert, mit Essigester gut gewaschen und aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt. Das abzentrifugierte Material wird mit Wasser verrührt und erneut zentrifugiert. Das mit Essigester auf das Filter gebrachte Produkt wird schließlich bei 80° i. Vak. bei  $10^{-2}$  Torr getrocknet: Schmp. 237° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-24.2 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-29.2^\circ$  ( $c = 1.3$ ; in 80-proz. Essigsäure). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 76.2 g (85%).

$C_{127}H_{203}N_{23}O_{31}Br_2$  (2708.0) Ber. C 56.33 H 7.65 Br 5.90 N 11.90  
Gef. C 56.37 H 7.68 Br 5.80 N 11.98

| Aminosäureanalyse: | Asp  | Tyr  | Ser  | Lys | Leu  | Arg  | Ala | Glu  | Phe | Val  | NH <sub>3</sub> |
|--------------------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|-----|------|-----------------|
| Ber.               | 3    | 2    | 2    | 1   | 1    | 2    | 1   | 1    | 1   | 1    | 1               |
| Gef.               | 3.06 | 2.02 | 1.87 | 1.0 | 1.03 | 2.02 | 1.0 | 1.01 | 1.0 | 0.99 | 1.20            |

15. *L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester-hydrobromid* [9-23c-Hydrobromid]: 35 g *Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [9-23b] in 1000 ccm Dimethylformamid, 100 ccm Wasser und 2000 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz bei 30–35° wie üblich hydriert, wobei durch Zutropfen von 0.1 n HBr pH 4 aufrecht erhalten wird (Verbrauch 130 ccm). Das Filtrat wird bei 20° Badtemp. i. Vak. eingedampft. Die verbleibende gallertartige Masse geht beim Verreiben mit Äther in ein leicht filtrierbares Granulat über; es wird abfiltriert und bei 80°/10<sup>-3</sup> Torr getrocknet: Schmp. 207°; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: –22.33 ± 1° bzw. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: –26.85° (c = 1.3; in 80-proz. Essigsäure). Chromatogr. rein (Whatman Nr. 1) in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 35 g (quantitativ).

C<sub>119</sub>H<sub>198</sub>N<sub>23</sub>O<sub>29</sub>Br<sub>3</sub> + 3 H<sub>2</sub>O (2708.9) Ber. C 52.90 H 7.52 Br 8.85 N 11.90

Gef. C 52.90 H 7.54 Br 8.85 N 12.02

[186/66]