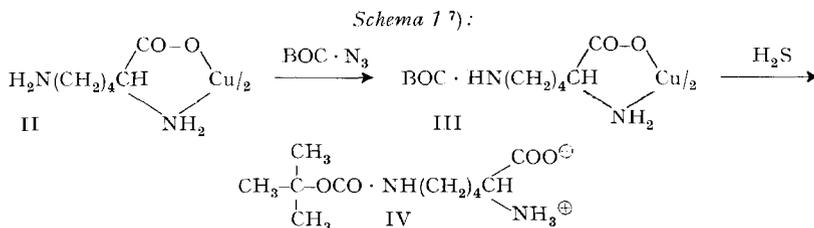


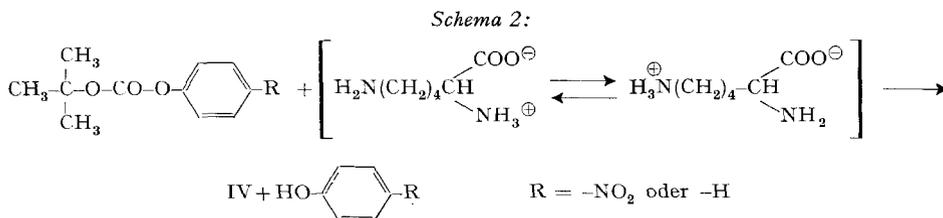
Derivate und Peptide des Lysins, die an der ϵ -Aminogruppe mit einem t-Butyloxycarbonylrest geschützt sind, dürften sich unseres Erachtens nach aber auch besonders eignen zu Synthesen von Peptiden, bei denen die ϵ -Aminogruppe des Lysins peptidisch verknüpft ist.

A) *N ϵ -t-Butyloxycarbonyl-L-lysin und Derivate* (Schemata 1, 2, 3)

N ϵ -t-Butyloxycarbonyl-L-lysin (IV) lässt sich aus Lysin-Kupfer (II)⁹⁾ über den schwerlöslichen Kupferkomplex III unter Verwendung von t-Butyl-azidoformiat¹⁰⁾ in etwa 30-proz. Ausbeute als mikrokristallines Pulver gewinnen (Schema 1).



ZAHN¹¹⁾ hat kürzlich die Herstellung von *N ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin* durch direkte Einwirkung von Kohlensäure-benzyl-p-nitrophenylester auf L-Lysin beschrieben. Dabei greift vorwiegend die basischere, sterisch weniger gehinderte *N ϵ -Aminogruppe* den aktivierten Ester an¹²⁾. Diese elegante Methode liess sich auch auf die Herstellung von *N ϵ -t-Butyloxycarbonyl-L-lysin* (IV) aus Lysin und Kohlensäure-t-butyl-p-nitrophenylester, bzw. -phenylester⁴⁾ anwenden (Schema 2).



Es entstanden bei dieser Reaktion nur wenige Prozente des α -Isomeren, welches durch Kristallisation entfernt werden konnte¹³⁾.

⁹⁾ Die Säurespaltung von Schutzgruppen in *N ϵ -Stellung* verläuft meist langsamer als in α -Stellung (wahrscheinlich wegen des fehlenden -I-Effekts der - protonisierten - α -Carbonylgruppe), wie wir in eigenen, unveröffentlichten Versuchen mit der c-Pentyloxycarbonyl-Gruppe am *N α -* und *N ϵ -* des Lysins feststellen konnten.

⁹⁾ A. C. KURTZ, J. biol. Chemistry 122, 477 (1938); 180, 1253 (1949).

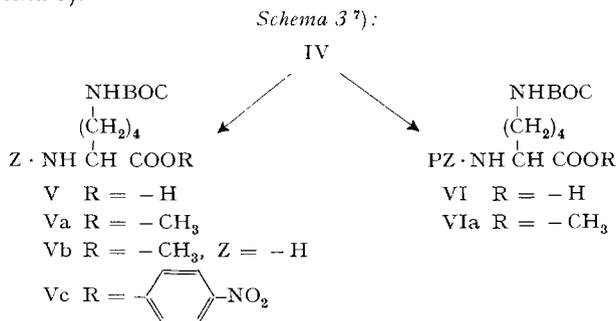
¹⁰⁾ L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. 79, 4427 (1957); L. A. CARPINO, C. A. GIZA & B. A. CARPINO, *ibid.* 81, 955 (1959); R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, Helv. 42, 2622 (1959).

¹¹⁾ H. ZAHN & H. R. FALKENBURG, Liebigs Ann. Chem. 636, 117 (1960).

¹²⁾ E. E. SCHALLENBERG & M. CALVIN, J. Amer. chem. Soc. 77, 2779 (1955); R. SCHWYZER, M. FEURER & B. ISELIN, Helv. 38, 83 (1955).

¹³⁾ Die Experimente wurden von Herrn P. SIEBER ausgeführt und sollen an anderer Stelle ausführlich beschrieben werden.

Durch Umsetzung mit Benzyloxycarbonylchlorid¹⁴⁾ oder mit p-Phenylazobenzyloxycarbonylchlorid¹⁵⁾ liessen sich die entsprechenden Derivate V und VI gewinnen (Schema 3).



Das Carbobenzoxyderivat V wurde bisher nur als Öl erhalten (> 90% Ausbeute). Mittels Diazomethan wurde es in den ebenfalls nicht kristallisierten Methylester Va übergeführt, der durch katalytische Hydrierung in Methanol N^ε-t-Butyloxycarbonyl-L-lysin-methylester (Vb) ergab; das Hydrochlorid dieser Verbindung liess sich kristallisieren. Ein ebenfalls kristallisiertes Derivat des N^α-Carbobenzoxy-N^ε-t-butyloxycarbonyl-L-lysins ist dessen p-Nitrophenylester (Vc), der durch Umsatz von V mit Di-p-nitrophenylsulfid¹⁶⁾ hergestellt wurde.

Im Gegensatz zu den Carbobenzoxyderivaten V und Va sind die p-Phenylazobenzyloxycarbonyl-Derivate VI und VIa gut kristallisierte Verbindungen. Da die direkte Kristallisation von VI aus dem Rohprodukt manchmal Schwierigkeiten bereite, wurde die Reinigung über den leichter kristallisierenden Methylester VIa vorgezogen, dessen Verseifung dann reinstes VI lieferte.

B) *H*·Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH und Derivate (Schema 4)

Die Kondensation von N^α-Carbobenzoxy-N^ε-t-butyloxycarbonyl-L-lysin (V) mit N^ε-t-Butyloxycarbonyl-L-lysin-methylester (Vb) nach der Methode von SHEEHAN¹⁷⁾ ergab in fast quantitativer Ausbeute N^α-(N^α-Carbobenzoxy-N^ε-t-butyloxycarbonyl-L-lysyl)-N^ε-t-butyloxycarbonyl-L-lysin-methylester (VII), dessen Schutzgruppen alle durch Behandlung mit konzentrierter Salzsäure (60 Min. bei 40°) entfernt werden konnten. Das entstandene L-Lysyl-L-lysin (VIII) war papierchromatographisch einheitlich (2 Systeme).

Durch katalytische Hydrierung (neutral, mit Pd-C in Methanol) wurde aus VII der N^α-(N^ε-t-Butyloxycarbonyl-L-lysyl)-N^ε-t-butyloxycarbonyl-L-lysin-methylester (IX) in Form eines papierchromatographisch einheitlichen Öles in quantitativer Ausbeute erhalten. Mit Triphenylchlormethan wurde aus diesem sein N^α-Tritylderivat X in ebenfalls ausgezeichneter Ausbeute hergestellt; durch Behandlung von X mit 75-proz. Essigsäure während 30 Min. bei 30° konnte die Tritylgruppe selektiv abgespalten und IX regeneriert werden. Alkalische Verseifung von X lieferte die freie

¹⁴⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932).

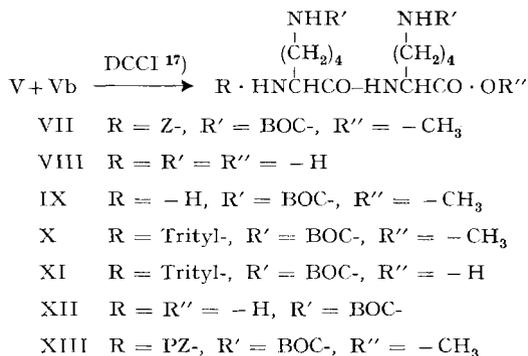
¹⁵⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, Helv. 41, 491 (1958).

¹⁶⁾ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. 40, 373 (1957).

¹⁷⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

Säure XI, welche sich, ebenfalls selektiv, zu XII enttritylieren liess. N^α-(N^α-p-Phenylazobenzoyloxy-carbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl)-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysin-methylester (XIII), endlich, wurde analog VII aus den beiden Lysinderivaten VI und Vb nach der Carbo-diimid-Methode¹⁷⁾ in allerdings nur 65-proz. Ausbeute hergestellt.

Schema 4⁷⁾:

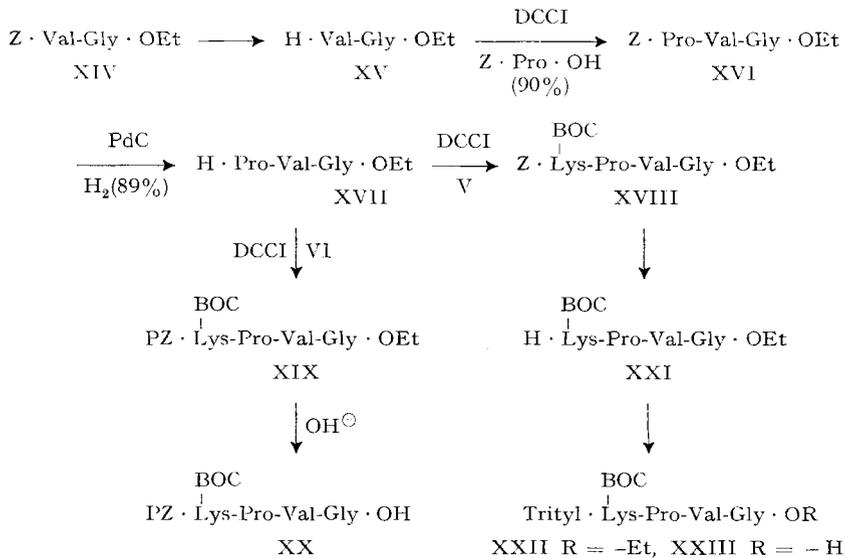


C) *H*-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OH und Derivate (Schema 5)

Die Synthese dieser Tetrapeptid-Derivate erfolgte stufenweise vom Carboxylende her. Carbobenzoxy-L-valyl-glycin-äthylester (XIV)¹⁸⁾ wurde durch katalytische Reduktion von der N-Schutzgruppe befreit und der Dipeptidester XV nach der Methode von SHEEHAN¹⁷⁾ mit Carbobenzoxy-L-prolin umgesetzt. Carbobenzoxy-L-propyl-L-valyl-glycin-äthylester (XVI) wurde dabei in kristalliner Form erhalten. Die Carbobenzoxy-gruppe wurde durch katalytische Hydrierung in Alkohol entfernt; der Tripeptidester XVII kristallisierte in freier Form. Die Kondensationen mit N^α-Carbobenzoxy-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysin (V) und mit N^α-p-Phenylazo-benzoyloxy-carbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysin (VI) erfolgten wiederum nach der Carbo-diimid-Methode¹⁷⁾. Das Carbobenzoxy-tetrapeptid-Derivat XVIII und das PZ-Tetrapeptid-Derivat XIX wurden beide in kristallisierter Form erhalten; die kleinere Ausbeute des zweiten Derivates, verglichen mit dem ersten, mag, wie im Beispiel der Dipeptid-Derivate VII und XIII, eine schlechtere Reaktionsfähigkeit des Lysin-Derivates mit dem grösseren α-Substituenten bei der Kondensation mit Dicyclohexyl-carbo-diimid widerspiegeln. Durch Verseifung von XIX wurde kristallisiertes N^α-p-Phenylazo-benzoyloxycarbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-propyl-L-valyl-glycin (XX) hergestellt.

Zur Einführung des Tritylrestes wurde das Carbobenzoxytetrapeptid-Derivat XVIII katalytisch hydriert, wobei der freie Ester XXI als papierchromatographisch einheitliches Öl anfiel; dieses wurde mit Triphenylchlormethan in üblicher Weise trityliert. Das Trityl-tetrapeptid-Derivat XXII wurde aus Äther-Petroläther als festes Pulver erhalten. Durch Verseifung liess sich N^α-Trityl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-propyl-L-valyl-glycin (XXIII) in ebenfalls amorpher, wenn auch fester Form gewinnen.

¹⁸⁾ L. HESLINGA & J. F. ARENS, Rec. trav. Chim. 76, 982 (1957).

Schema 5⁷):

Experimenteller Teil

Smp. wurden in der Kapillare bestimmt und sind unkorrigiert. «Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Eindampfen des Reaktionsgemisches bei 40°, Aufnehmen des Rückstandes in Essigester (oder Methylenchlorid), Waschen der organischen Phase unter Eiskühlung mit verdünnter Zitronensäurelösung, Wasser, verdünnter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen. Dem zur Chromatographie verwendeten Silikagel («Mesh 200» der Firma DAVISON) wurde jeweils 10 Gew.-% Wasser zugesetzt.

Für die papierchromatographische Untersuchung¹⁹⁾ (absteigend auf WHATMAN-Papier Nr. 3) dienten folgende Lösungsmittelsysteme (Zahlenangaben bedeuten ml, wenn nicht anders angegeben):

System 40: n-Butanol-Alkohol-Wasser	= 2:2:1
System 41: t-Butanol-n-Butanol-Wasser	= 4:3:3
System 42: n-Propanol-Essigester-Wasser	= 7:1:2
System 43: t-Amylalkohol-Isopropanol-Wasser	= 100:40:55
System 45: sec-Butanol-3-proz. Ammoniak	= 100:44
System 50: t-Amylalkohol-Isopropanol-Triäthylamin-Veronal-Wasser	= 100:40:0,8:1,8 g:50
System 54: sec-Butanol-Isopropanol-Monochloressigsäure-Wasser	= 70:10:3 g:40

1. *N^ε-BOC-L-lysin (IV)*. – a) *Kupferkomplex (III)*: Eine Lösung von 10,0 g L-Lysin-mono-hydrochlorid (0,055 Mol) in 80 ml Wasser wurde mit 10 g basischem Kupfercarbonat (2 CuCO₃, Cu(OH)₂) versetzt und dann 30 Min. zum Sieden erhitzt. Die tiefblaue Lösung wurde noch heiss vom ungelösten Kupfercarbonat abgenutscht und mit etwas heissem Wasser nachgewaschen. Die Kupferlysinat-Lösung (Volumen 90 ml) wurde abgekühlt, mit 3 g MgO versetzt und dann unter intensivem Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 11,5 g t-Butylazidoformiat¹⁰⁾ (0,080 Mol) in 150 ml Methanol versetzt. Das dunkelgrüne Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 45° gerührt. Dabei schied sich der Kupferkomplex des *N^ε-BOC-lysins* als feiner, hellblauer Niederschlag aus. Zur Entfernung von überschüssigem Magnesiumoxyd wurden unter Kühlung in Eis 50 ml 2 N Essigsäure zugegeben und das Ganze 1 Std. bei 2° gerührt. Hierauf wurde der Kupferkomplex abgenutscht, mit Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet. Es wurden 7,14 g

¹⁹⁾ In verdankenswerter Weise ausgeführt in unserem Papierchromatographie-Laboratorium (Leitung Dr. R. NEHER).

N^ε-BOC-L-lysin-kupfer (III), Smp. 230–240°, erhalten (Ausbeute ca. 30% berechnet auf t-Butyl azidoformiat).

C ₂₂ H ₄₂ O ₈ N ₄ Cu	Ber. C 47,68	H 7,64	N 10,11	Cu 11,47%
(554,15)	Gef. „ 47,2	„ 7,3	„ 10,2	„ 11,3 %

b) Freisetzung von N^ε-BOC-L-lysin (IV) aus dem Kupferkomplex: 14,0 g Kupferkomplex (0,0253 Mol) wurden fein pulverisiert und in 300 ml Wasser suspendiert. Hierauf wurde in Eis gekühlt, mit 50 ml 2 N Ammoniaklösung versetzt und unter intensivem Rühren während 3 Std. H₂S eingeleitet. Hierauf wurden zur Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffs unter Eiskühlung 75 ml 2 N Essigsäure zugegeben und solange Luft durchgeblasen, bis der H₂S-Geruch verschwunden war. Nach Abnutschen des Kupfersulfids durch ein Kohlefilter und Einengen des Filtrats fiel das N^ε-BOC-L-lysin in Form eines feinen, gallertigen Niederschlags aus. Es wurde abgenutscht und mit wenig Eiswasser gewaschen. Das Filtrat gab bei erneutem Einengen noch mehrere Anteile des gleichen Produkts. Insgesamt wurden 11,0 g N^ε-BOC-L-lysin (IV) vom Smp. ca. 220–255° erhalten. Das Produkt enthält nach Papierchromatographie noch etwa 1% Lysin als Beimischung. Zur Analyse wurde zweimal aus Wasser umgefällt, Smp. 237–255°; $[\alpha]_D^{26} = +4,7 \pm 1^\circ$ ($c = 0,882$ in 2 N NH₃).

C ₁₁ H ₂₂ O ₄ N ₂ (246,30)	Ber. C 53,64	H 9,00	N 11,37%	Gef. C 53,44	H 8,73	N 11,67%
--	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Das Produkt ist merklich löslich in Wasser, Methanol und Dimethylformamid; schwer löslich in Aceton, Äther; leicht löslich in Alkalien und verdünnter Essigsäure; in wässriger Mineralsäure löslich unter Zersetzung (vgl. unten). Bei Papierchromatographie Rf-Wert = 0,72 (System 41); = 0,80 (System 54). Gegenüber Säuren verschiedener Stärke verhält sich N^ε-BOC-L-lysin (IV) folgendermassen:

2 N Essigsäure:	24 Std. bei 25°: keine Abspaltung der BOC-Gruppe beobachtet
Eisessig:	24 Std. bei 25°: keine Abspaltung der BOC-Gruppe beobachtet
50-proz. und 75-proz. Essigsäure:	30 Min. bei 30°: keine Abspaltung der BOC-Gruppe beobachtet (Unter diesen Bedingungen wird ein Trityl-rest an einer α-Aminogruppe vollständig abgespalten.)
Trifluoressigsäure (wasserfrei):	1 Std. bei 25°: vollständige Abspaltung.
2 N Salzsäure:	bei 25° unter Gasentwicklung vollständige Abspaltung in ca. 30 Min.
Konz. Salzsäure:	bei 25° unter Aufschäumen vollständige Abspaltung in wenigen Sek. ²⁰⁾

2. N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysin (V). 30,0 g N^ε-BOC-L-lysin (0,122 Mol) wurden in üblicher Weise¹⁴⁾ carbobenzoxyliert. Die wässrig-alkalische Phase wurde mit Äther gewaschen, mit Essigester überschichtet und auf 2° gekühlt. Hierauf wurde mit fester Zitronensäure angesäuert, das ölige Produkt im Essigester aufgenommen und die Essigesterlösung mehrmals mit Wasser gewaschen. Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen gab 43,4 g V als Öl, das bisher nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte (Ausbeute 93% d. Th.); $[\alpha]_D^{26} = -2,4 \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,04$ in Aceton). Das Produkt ist in den meisten organischen Lösungsmitteln leicht löslich, schwer löslich in Petroläther.

C ₁₉ H ₂₈ O ₆ N ₂ (380,43)	Ber. C 59,98	H 7,42	N 7,36%	Gef. C 59,78	H 7,41	N 7,17%
--	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

3. N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysin-methylester (Va): N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysin (V), in ätherischer Lösung mit Diazomethan verestert und wie üblich aufgearbeitet, gab N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysin-methylester als Öl; $[\alpha]_D^{26} = -10,6 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,90$ in Aceton).

C ₂₀ H ₃₀ O ₆ N ₂ (394,46)	Ber. C 60,89	H 7,67	N 7,10%	Gef. C 60,71	H 7,95	N 7,03%
--	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

4. N^ε-BOC-L-lysin-methylester (Vb): 265 mg (0,67 mMol) N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysin-methylester, gelöst in 5 ml Methanol, wurden in Gegenwart von Palladiumkohle (10% Pd) hydriert. Das bei der Hydrierung entstehende CO₂ wurde in einem zweiten mit Natronlauge gefüllten Hydriergefäss absorbiert. Nach 1 Std. kam die Wasserstoffaufnahme (ber. 15,0 ml, gef. 17,0 ml H₂) zum Stillstand. Die Lösung wurde vom Katalysator abfiltriert und eingedampft. Das erhaltene Derivat Vb ist ein Öl, es erwies sich bei Papierchromatographie als einheitlich; Rf-Wert = 0,85 (System 40); = 0,80 (42). Weitere Charakterisierung durch das kristalline Hydrochlorid: Eine

²⁰⁾ Die Entfernung einer Carbenbenzoxy-Gruppe gelingt mit konz. Salzsäure erst nach ca. 1stündigem Erwärmen auf 40°.

Probe des öligen Esters Vb wurde in Äther gelöst, die Lösung auf -10° gekühlt und unter intensivem Rühren tropfenweise mit der genau berechneten Menge $0,5N$ HCl in Methanol versetzt. Das Hydrochlorid des N^{ϵ} -BOC-L-lysin-methylesters kristallisierte dabei in feinen Nadeln aus, Smp. $158-159^{\circ}$. Umkristallisation aus Methanol-Äther gab analysenreines Material vom gleichen Smp.; $[\alpha]_D^{25} = +19,0^{\circ} \pm 1,0^{\circ}$ ($c = 1,09$ in Methanol).

$C_{12}H_{24}O_4N_2$, HCl	Ber. C 48,56	H 8,49	N 9,44	Cl 11,95%
(296,81)	Gef. „ 48,43	„ 8,43	„ 9,43	„ 12,28%

5. N^{α} -Z- N^{ϵ} -BOC-L-lysin-p-nitrophenylester (Vc): Eine Lösung von 546 mg N^{α} -Z- N^{ϵ} -BOC-L-lysin (V) (1,43 mmol) in 2 ml absolutem Pyridin wurde mit 492 mg (1,52 mmol) Di-p-Nitrophenylsulfid¹⁶) versetzt und 16 Std. bei 25° belassen. Nach Eindampfen des Pyridins im Vakuum wurde der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und die Lösung unter Eiskühlung mit verdünnter Zitronensäure und Wasser gewaschen. Zur Entfernung von p-Nitrophenol wurde dann mehrmals mit einem Gemisch von 1 Teil $0,5M$ Pottaschelösung und 2 Teilen $0,5M$ Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgezogen und dann wieder mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther 550 mg (77%) Vc vom Smp. (85°) $87-90^{\circ}$. Zur Analyse wurde aus Essigester-Äther und Aceton-Äther umkristallisiert, Smp. $88-91^{\circ}$; $[\alpha]_D^{26} = -14,8^{\circ} \pm 1,0^{\circ}$ ($c = 1,13$ in Aceton).

$C_{25}H_{31}O_8N_3$ (501,52)	Ber. C 59,87	H 6,23	N 8,38%	Gef. C 59,99	H 6,16	N 8,61%
-------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

6. N^{α} -PZ- N^{ϵ} -BOC-L-lysin (VI): 2,46 g (0,010 Mol) N^{ϵ} -BOC-L-lysin sowie 1,0 g MgO wurden in 20 ml Wasser suspendiert. Nach Zugabe von 20 ml Dioxan wurde auf 5° gekühlt und unter intensivem Rühren im Verlauf von 1 Std. eine Lösung von 3,30 g (0,0125 Mol) PZ-chlorid¹⁵) in 30 ml Dioxan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt, sodann mit Wasser versetzt, mit Essigester überschichtet, in Eis gekühlt und angesäuert. Die stark orange-gefärbten Essigesterzüge wurden zuerst mit etwas Wasser, dann so oft mit verdünnter Ammoniak-Lösung gewaschen, bis die Ammoniakzüge nur noch schwach gelb gefärbt waren. Diese wurden vereinigt, auf 2° gekühlt, angesäuert und das ausgeschiedene, orange Harz (rohes VI) in Essigester aufgenommen. Die Essigester-Lösung gab nach Waschen mit Wasser und Trocknen 2,80 g oranges Harz. Aus dem Rohprodukt schied sich nach längerem Stehen in Aceton-Äther 0,70 g kristallines N^{α} -PZ- N^{ϵ} -BOC-L-lysin, Smp. $103-105^{\circ}$ aus. Die Mutterlauge lieferte direkt keine weiteren Kristalle mehr; erst nach Chromatographie an der 50fachen Menge Silikagel gaben die mit Benzol-Chloroform 1:4-Gemisch und mit Chloroform eluierten Anteile aus Aceton-Äther noch weitere 0,70 g VI, vom gleichen Smp. Zur Analyse wurde dreimal aus Äther-Petroläther kristallisiert, Smp. $105-106^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25} = -1,0^{\circ} \pm 1,0^{\circ}$ ($c = 1,00$ in Methanol).

$C_{25}H_{32}O_6N_4$ (484,54)	Ber. C 61,96	H 6,66	O 19,81%	Gef. C 62,13	H 6,82	O 19,90%
-------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Das Produkt ist leicht löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln (ausser Petroläther), löslich in verdünnten Alkalien, schwer löslich in Wasser. Da die Gewinnung von kristallinem VI aus dem Rohprodukt schwierig war, wurde bei grösseren Ansätzen eine Reinigung über den kristallinen N^{α} -PZ- N^{ϵ} -BOC-L-lysin-methylester (VIa) vorgezogen: 18,9 g rohes VI (oranges Harz) wurden in Methylenchlorid gelöst und mit Diazomethan methyliert. Übliche Aufarbeitung ergab 19,5 g rohen Ester VIa. Er wurde in 1 l Benzol-Petroläther 1:1-Gemisch gelöst und über eine Säule von 1 kg Silikagel filtriert. Die Säule wurde mit je 1 l Benzol, Benzol-Chloroform-Gemisch = 9:1 und 2:1 entwickelt, wobei sich drei von einander getrennte orange-rote Zonen bildeten. Das Silikagel wurde hierauf aus der Säule entnommen und die drei Zonen einzeln mit Methanol eluiert. Die am schnellsten gewanderte Bande (Hauptmenge 18,8 g) gab aus wenig Aceton 14,7 g kristallines N^{α} -PZ- N^{ϵ} -BOC-L-lysin-methylester, Smp. $88-92^{\circ}$. Zur Analyse wurde zweimal aus Äther-Petroläther kristallisiert, Smp. $93-94^{\circ}$; $[\alpha]_D^{27} = -5,5^{\circ} \pm 1,0^{\circ}$ ($c = 1,086$ in Aceton).

$C_{26}H_{34}O_6N_4$ (498,56)	Ber. C 62,63	H 6,87	O 19,26%	Gef. C 62,79	H 7,09	O 19,30%
-------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Der kristalline N^{α} -PZ- N^{ϵ} -BOC-L-lysin-methylester wurde wie unten beschrieben verseift; das aus der Verseifung erhaltene Rohprodukt kann ohne Reinigung zu weiteren Umsätzen verwendet werden (vgl. Darstellung von XIII und XIX). 13,0 g VIa (0,0261 Mol), Smp. $88-92^{\circ}$, wurden gelöst in 270 ml Dioxan, 90 ml Wasser zugegeben, die Lösung auf 5° gekühlt und mit 31 ml $1,0N$ NaOH versetzt. Nach 2 Std. bei 5° wurden 500 ml Wasser zugegeben und die über-

schüssige Natronlauge durch Zugabe von etwas festem CO_2 neutralisiert. Hierauf wurde das Dioxan im Vakuum abdestilliert, die verbleibende wässrige Phase klar filtriert, auf 2° gekühlt, mit Äther überschichtet und mit fester Zitronensäure angesäuert. Das ausgefallene Produkt (rohes VI) wurde im Äther aufgenommen, die Äther-Lösung mit Wasser gewaschen, getrocknet, auf ein kleines Volumen eingedampft und das N^α -PZ- N^ϵ -BOC-L-lysin durch Zugabe von viel Petroläther ausgefällt. Es wurden 12,07 g VI (96%) in Form eines festen Pulvers, Smp. $96\text{--}104^\circ$, erhalten.

7. N^α -Z- N^ϵ -BOC-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin-methylester (VII) nach der Methode von SHEEHAN¹⁷): 306 mg N^ϵ -BOC-L-lysin-methylester (1,18 mMol) und 493 mg N^α -Z- N^ϵ -BOC-L-lysin (1,30 mMol) wurden in 15 ml Acetonitril gelöst. Die auf -15° gekühlte Lösung wurde mit 293 mg Dicyclohexyl-carbodiimid (1,42 mMol) versetzt. Nach 30 Min. bei -15° und 14 Std. bei 2° wurde der Dicyclohexylharnstoff abgenutscht (288 mg), das Filtrat eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Die neutralen Anteile (881 mg) wurden zur Entfernung des überschüssigen Dicyclohexyl-carbodiimids erst mit Petroläther zerrieben und dann aus Äther-Petroläther kristallisiert. Es wurden 670 mg kristallines VII als Nadeln vom Smp. $66\text{--}70^\circ$ erhalten. Zur Analyse wurde dreimal aus Äther umkristallisiert, Smp. $78\text{--}84^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -5,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,006$ in Aceton).

$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_9\text{N}_4$ (622,74) Ber. C 59,79 H 8,09 N 9,00% Gef. C 59,93 H 8,15 N 9,02%

Nach Entfernung aller Schutzgruppen durch Hydrolyse mit konz. HCl (60 Min. bei 40°) erwies sich das freie L-Lysyl-L-lysin VIII als papierchromatographisch einheitlich; Laufstrecke 11 cm nach 33 Std. Laufzeit (System 45); Rf-Wert = 0,18 (System 54).

N^ϵ -BOC-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin-methylester (IX): 400 mg VII (0,64 mMol), gelöst in 30 ml Methanol, wurden in Gegenwart von 100 mg Palladiumkohle (10% Pd) hydriert. Das bei der Hydrierung entstehende CO_2 wurde in einem zweiten, mit Natronlauge gefüllten Hydriergefäß aufgefangen. Nach Beendigung der Hydrierung wurde vom Katalysator abgenutscht und das Filtrat eingedampft. Es wurden 311 mg IX (99%) als Öl erhalten; das Material erwies sich nach Papierchromatographie als einheitlich, Rf-Wert = 0,90 (System 40); 0,90 (System 42).

8. N^α -Trityl- N^ϵ -BOC-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin-methylester (X): Die Lösung von 8,35 g IX (0,0171 Mol) in 120 ml trockenem Methylenchlorid wurde mit 2,80 ml absolutem Triäthylamin (0,020 Mol) sowie 5,30 g (0,019 Mol) reinstem Triphenylchlormethan versetzt. Nach 20 Std. bei 15° wurde wie üblich aufgearbeitet. Die neutralen Anteile (12,51 g) gaben aus Äther-Petroläther 21,38 g kristallines Dipeptidderivat X vom Smp. $132\text{--}135^\circ$ (Ausbeute 91% d. Th.). Zur Analyse wurde zweimal aus dem gleichen Gemisch umkristallisiert, Smp. $134\text{--}137^\circ$; $[\alpha]_D^{24} = +3,7^\circ \pm 0,8^\circ$ ($c = 1,09$ in Methanol).

$\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{N}_4$ (730,92) Ber. C 69,01 H 8,00 O 15,32% Gef. C 69,22 H 7,99 O 15,33%

Selektive Enttritylierung: 2 mg des Trityl-dipeptid-derivates X wurden in 0,1 ml 75-proz. Essigsäure gelöst und 30 Min. bei 30° belassen. Hierauf wurde im Hochvakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand getrocknet. Das enttritylierte Produkt erwies sich nach Papierchromatographie als einheitlich und identisch mit dem aus der Hydrierung von VII erhaltenen Dipeptid-ester IX.

9. N^α -Trityl-(N^ϵ -BOC)-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin (XI): 5,63 g X (7,7 mMol) wurden in 100 ml Dioxan, 30 ml Wasser und 8,5 ml 1,0N Natronlauge gelöst. Die klare Lösung wurde 2 Std. bei Raumtemperatur belassen, hierauf mit viel Wasser versetzt, durch Zugabe von etwas festem CO_2 auf pH = 8 gebracht und das Dioxan im Vakuum bei 40° Badtemperatur entfernt. Dabei fiel das Natriumsalz von XI in Form einer Gallerte aus. Es wurde durch Zugabe von viel Wasser und Erwärmen auf 40° in Lösung gebracht, die Lösung wurde von einer Spur ungelöstem Material abgenutscht, das Filtrat auf 2° abgekühlt und durch Zugabe von fester Zitronensäure auf pH = 2 angesäuert. Der feine Niederschlag wurde abgenutscht, mit viel Eiswasser gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es wurden 5,17 g XI (95%) als farbloses Pulver vom Smp. ca. $75\text{--}100^\circ$ erhalten; $[\alpha]_D^{24} = +1,0^\circ \pm 0,7^\circ$ ($c = 0,98$ in Methanol).

$\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_7\text{N}_4$ (716,89) Ber. C 68,69 H 7,87 O 15,62% Gef. C 68,55 H 8,06 O 15,55%

Selektive Enttritylierung wie bei X angegeben gab papierchromatographisch reines N^ϵ -BOC-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin (XII), Rf-Wert = 0,88 (System 40); = 0,86 (System 42).

10. N^α -PZ-(N^ϵ -BOC)-L-lysyl-(N^ϵ -BOC)-L-lysin-methylester (XIII): 5,19 g (20,0 mMol) Vb und 9,70 g (20,0 mMol) VI wurden in 120 ml Acetonitril gelöst. Die auf -15° gekühlte Lösung

wurde mit 4,35 g (21,0 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 30 Min. bei -15° und 2 Tagen bei 2° war das Reaktionsgemisch gallertig erstarrt. Zugabe von viel Essigester brachte das orange, gallertige Material in Lösung, während der Dicyclohexylharnstoff (4,14 g entsprechend 91% d. Th.) ungelöst blieb. Die Essigester-Lösung wurde wie üblich aufgearbeitet und gab 16,3 g Neutralteil (oranges Harz). Zerreiben mit Äther gab 10,88 g Rohkristalliat vom Smp. (111°) $121-127^{\circ}$ (Aufarbeitung der Mutterlauge vgl. unten). Die Kristalle enthielten noch etwas Dicyclohexylharnstoff; sie wurden mit Aceton versetzt, wobei 175 mg Dicyclohexylharnstoff ungelöst blieben. Aus dem Filtrat wurde durch Zugabe von viel Äther 9,14 g Dipeptidderivat XIII vom Smp. (122°) $124-127^{\circ}$ erhalten. Zur Analyse wurde zweimal aus Äther kristallisiert, Smp. $124-127^{\circ}$; $[\alpha]_D^{26} = -2,0^{\circ} \pm 0,8^{\circ}$ ($c = 1,00$ in Methanol).

$C_{37}H_{54}O_9N_6$ (726,85) Ber. C 61,14 H 7,49 N 11,56% Gef. C 61,19 H 7,51 N 11,73%

Aus der Mutterlauge des Rohkristalliates (10,88 g) wurden durch Chromatographie an Silikagel und Eluieren mit Chloroform noch weitere 315 mg kristallines XIII, Smp. $124-127^{\circ}$ erhalten. Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Dipeptidderivat betrug 65% d. Th.

11. *N α -Z-N ϵ -BOC-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XVIII)*: Zu einer auf -15° gekühlten Lösung von 44,4 g (0,148 Mol) L-Prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XVII) (Darstellung vgl. unten) und 62,0 g *N α -Z-N ϵ -BOC-L-lysin* (0,163 Mol) in 1 l Acetonitril wurden 36,7 g (0,178 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben. Nach 1 Std. bei -15° und 15 Std. bei 2° war das Reaktionsgemisch gallertig erstarrt. Der gallertige Brei wurde mit 1 l Aceton zerrieben und der ungelöst gebliebene Dicyclohexylharnstoff abgenutscht (37,5 g). Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand wie üblich aufgearbeitet. Die neutralen Anteile wurden mit Äther zerrieben und das ätherunlösliche Material (96,6 g) aus Aceton-Äther kristallisiert. Es wurden 74,5 g kristallines XVIII, Smp. (122°) $132-135^{\circ}$ erhalten. Die Mutterlauge dieser Kristalle gab aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch noch weitere 10,9 g Material vom Smp. (120°) $130-133^{\circ}$; die Gesamtausbeute an kristallinem XVIII betrug 87% d. Th. (berechnet auf eingesetzten Tripeptidester). Der gegenüber der analysenreinen Substanz (vgl. unten) merklich tiefere Smp. des Rohkristalliates XVIII ist bedingt durch Beimengung von wenig gallertig ausgeschiedenem Produkt. Drehung und papierchromatographisches Verhalten des Rohkristalliates sind aber gleich wie beim analysenreinen Produkt. Zur Analyse wurde dreimal aus warmem Aceton langsam auskristallisieren gelassen, Smp. $142-144^{\circ}$; $[\alpha]_D^{26} = -77,7^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 0,864$ in Alkohol).

$C_{33}H_{51}O_9N_5$ (661,78) Ber. C 59,89 H 7,77 N 10,58% Gef. C 59,84 H 7,76 N 10,64%

Nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Hydrolyse mit konz. Salzsäure (90 Min. bei 40°) erwies sich das freie L-Lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin als papierchromatographisch einheitlich; Rf-Wert = 0,19 (System 45); = 0,15 (System 50).

12. *L-Prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XVII)*: 9,00 g (0,0208 Mol) Carbobenzoyloxy-L-prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XVI) (Darstellung vgl. unten) wurden in 200 ml Alkohol gelöst und hydriert, wie bei Vb beschrieben. Nach 1 Std. und Aufnahme von 463 ml Wasserstoff (ber. 466 ml) kam die Hydrierung zum Stillstand. Es wurde vom Katalysator abgenutscht und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand gab aus Äther 4,82 g Tripeptidester in Nadeln vom Smp. $126-128^{\circ}$. Aus dem Filtrat wurden nach Einengen noch weitere 0,70 g XVII vom Smp. $121-123^{\circ}$ erhalten (Ausbeute an krist. Produkt: 89% d. Th.). Zur Analyse wurde dreimal aus Alkohol-Äther umkristallisiert, Smp. $127-128^{\circ}$; $[\alpha]_D = -74,8^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,08$ in Alkohol).

$C_{14}H_{25}O_4N_3$ (299,36) Ber. C 56,17 H 8,42 N 14,04% Gef. C 56,25 N 8,67 N 14,04%

Bei Papierchromatographie im System 42 zeigte das Produkt nur einen Fleck; Rf = 0,77 mit gelber Ninhydrinfärbung.

Das zu obigem Versuch verwendete Tripeptid-Derivat XVI war wie folgt dargestellt worden: Carbobenzoyloxy-L-valyl-glycin-äthylester (XIV)¹⁸⁾ wurde in Gegenwart von 1 Äqu. Salzsäure wie oben beschrieben hydriert. Das so erhaltene, amorphe Dipeptidester-hydrochlorid wurde in üblicher Weise in die freie Base XV übergeführt. Kondensation des amorphen Dipeptid-esters XV mit genau 1 Äqu. Carbobenzoyloxy-L-prolin in Gegenwart von 1,1 Äqu. Dicyclohexyl-carbodiimid gab in 90% Ausbeute das kristalline Tripeptidderivat XVI, Smp. (154°) $156-159^{\circ}$ (aus Aceton). Zur Analyse wurde aus Alkohol-Äther und Acetonitril umkristallisiert, Smp. $156-159^{\circ}$; $[\alpha]_D^{29} = -87,4^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 0,962$ in Methanol).

$C_{22}H_{31}O_6N_3$ (433,49) Ber. C 60,95 H 7,21 N 9,69% Gef. C 61,00 H 7,30 N 9,46%

13. *N^ε-BOC-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XXI)*: 2,00 g (3,02 mMol) Tetrapeptid-derivat XVIII wurden genau wie bei Vb beschrieben, hydriert. Nach Abnutschen des Katalysators und Eindampfen des Filtrats wurden 1,59 g (99%) des freien Tetrapeptidesters XXI als farbloses Öl erhalten. Das Produkt erwies sich bei Papierchromatographie als einheitlich, Rf-Wert = 0,85 (System 40); = 0,83 (System 43).

14. *N^α-Trityl-(N^ε-BOC)-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XXII)*: 963 mg (1,82 mMol) Tetrapeptidester XXI wurden genau wie bei X angegeben trityliert. Übliche Aufarbeitung des Tritylierungsgemisches gab 1,40 g rohes Trityl-Derivat XXII; das Produkt enthielt als Beimengung noch etwas Triphenylchlormethan. Zur Reinigung wurde es mehrmals aus Äther-Lösung mit Petroläther ausgefällt, es wurde ein Pulver vom Smp. ca. 100° erhalten; $[\alpha]_D^{26} = -17,0 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,98$ in Methanol).

$C_{44}H_{59}O_7N_5$ (769,95) Ber. C 68,63 H 7,72 N 9,10% Gef. C 68,34 H 7,76 N 9,00%

15. *N^α-Trityl-(N^ε-BOC)-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin (XXIII)*: 1,20 g (1,56 mMol) Trityl-tetrapeptid-Derivat XXII wurden, wie bei XI beschrieben, verseift. Es wurden 1,07 g (91%) XXIII als Pulver vom Smp. ca. 100–110° erhalten; das Produkt konnte bis jetzt nicht kristallin erhalten werden. Zur Analyse wurde aus ammoniakalischer Lösung mit verdünnter Essigsäure, dann aus Äther-Petroläther umgefällt; Smp. 102–120°; $[\alpha]_D^{26} = -7,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,710$ in 2N NH_3). Die Substanz ist leicht löslich in organischen Lösungsmitteln, ausser in Petroläther; schwer löslich in Wasser; löslich in verdünnten Alkalien.

$C_{42}H_{55}O_7N_5$ (741,90) Ber. C 67,99 H 7,47 N 9,44% Gef. C 67,61 H 7,39 N 9,68%

16. *N^α-PZ-(N^ε-BOC)-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin-äthylester (XIX)*: Dieses Tetrapeptid-Derivat wurde aus *N^α-PZ-N^ε-BOC-L-Lysin (VI)* und *L-Prolyl-L-valyl-L-glycin-äthylester (XVII)* genau gleich, wie beim Carbobenzoxy-derivat XVIII beschrieben, dargestellt. Der nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Neutralteil wurde zur Vorreinigung gründlich mit Äther zerrieben; die ätherunlöslichen Anteile wurden an Silikagel chromatographiert. Die mit Benzol-Chloroform = 1:4-Gemisch und Chloroform eluierten Anteile gaben aus heissem Acetonitril beim langsamen Abkühlen das kristalline [Tetrapeptid-Derivat XIX in Nadeln vom Smp. 147–149° (Ausbeute ca. 60%)]. Zur Analyse wurde aus Aceton und Acetonitril kristallisiert, Smp. 149–150°; $[\alpha]_D^{26} = -70,5^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,02$ in Methanol).

$C_{39}H_{55}O_8N_7$ (765,93) Ber. C 61,16 H 7,24 N 12,80% Gef. C 61,05 H 7,22 N 12,72%

17. *N^α-PZ-N^ε-BOC-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin (XX)*: Das Tetrapeptid-Derivat XIX wurde, wie bei XI beschrieben, verseift. Das rohe Verseifungsprodukt ist ein oranges Pulver, Smp. ca. 90–105°; es ist für weitere Umsetzungen genügend rein. Eine Probe des Materials kristallisierte nach längerem Stehen in Aceton und wurde zur Analyse nochmals aus Aceton kristallisiert; Smp. 127–130°; $[\alpha]_D^{27} = -64,9^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 0,801$ in Methanol). Die Substanz ist löslich in sehr verdünnten Alkalien; in 1N Natronlauge oder Sodalösung bildet sich ein unlösliches Natriumsalz.

$C_{37}H_{51}O_9N_7$ (737,87) Ber. C 60,23 H 6,97 N 13,29% Gef. C 60,28 H 7,10 N 13,07%

Wir danken Herrn Hr. MEIER für die sorgfältige Ausführung vieler Versuche. Die Mikroanalysen wurden in unseren mikroanalytischen Laboratorien unter der Leitung von Herrn Dr. W. PADOWETZ ausgeführt.

SUMMARY

For the synthesis of β^{1-19} -corticotropin-Glu⁵- γ -amide¹) a derivative of lysine was needed involving a blocking group on N^ε easily removable by mild acid treatment. N^ε-t-Butoxycarbonyl-L-lysine was synthesized and found to be a very versatile compound. The N^ε-t-butoxycarbonyl group is readily removed by trifluoroacetic acid and by aqueous HCl, it is not cleaved by anhydrous or aqueous acetic acid in the experimental conditions described here. This allows its use in conjunction with the N-trityl group which is easily hydrolysed by aqueous acetic acid. Needless to point out, it may also be used along with the carbobenzoxy or p-phenylazocarbobenzoxy

groups which may preferentially be removed by catalytic hydrogenation. A number of derivatives and peptides of N^ε-t-butoxycarbonyl-L-lysine are described, among these are trityl-Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH⁷⁾ and PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OH, both intermediates in the synthesis of the nonadecapeptide with high corticotropic activity¹⁾. The derivatives described here should also be useful for the preparation of ε-peptides of lysine.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

21. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau eines corticotrop wirksamen Nonadecapeptids¹⁾

II. Derivate des L-Seryl-L-tyrosyl-L-serins

von B. Iselin und R. Schwyzer

(6. XII. 60)

Die Synthese von Derivaten des Tripeptids L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin (Aminosäuresequenz 1 bis 3 des β-Corticotropins¹⁾) unter Verwendung des Carbobenzoxysterests zum Schutze der Aminogruppe des N-terminalen Serins ist schon mehrfach beschrieben worden^{2) 3) 4)}. Für den Aufbau des ACTH-wirksamen Nonadecapeptids β¹⁻¹⁹-Corticotropin-Glu⁵-γ-amid¹⁾ benötigten wir jedoch ein Tripeptidderivat, dessen Aminogruppe durch einen mittels Säurekatalyse leicht abspaltbaren Rest geschützt ist. Wir haben zu diesem Zweck die t-Butyloxycarbonylgruppe gewählt und, ausgehend von t-Butyloxycarbonyl-L-serin-hydrazid (A 1), die Tripeptidderivate B 1–3 und C 1–3 auf dem im untenstehenden Reaktionsschema gezeigten Weg aufgebaut. Das Zwischenprodukt B 1–3 haben wir auch durch Einführung der t-Butyloxycarbonylgruppe in den freien, kristallinen L-Seryl-L-tyrosyl-L-serin-methylester mittels t-Butyloxycarbonylazid^{5) 6)} oder t-Butyloxycarbonyl-p-nitrophenol⁷⁾ erhalten.

Auffallend ist die Beständigkeit der säureempfindlichen t-Butyloxycarbonylgruppe unter den stark sauren Bedingungen, die bei der Überführung eines Säurehydrazids in das entsprechende Azid allgemein angewendet werden⁸⁾. Bei der Herstellung des t-Butyloxycarbonyl-L-serin-azids haben wir festgestellt, dass zwar bei 0°

¹⁾ R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, *Angew. Chem.* **72**, 915 (1960).

²⁾ K. HOFMANN, A. JÖHL, A. F. FURLLENMEIER & H. KAPPELER, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1636 (1957).

³⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **41**, 1852 (1958).

⁴⁾ B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1760 (1960).

⁵⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, *Helv.* **42**, 2622 (1959).

⁶⁾ Herstellung von t-Butyloxycarbonylazid: L. A. CARPINO, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4427 (1957); L. A. CARPINO, C. A. GIZA & B. A. CARPINO, *ibid.* **81**, 955 (1959); L. A. CARPINO, *ibid.* **82**, 2725 (1960).

⁷⁾ G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).

⁸⁾ Vgl. R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **43**, 1910 (1960).