

## RÉSUMÉ

Par oxydation de ptérines auxquelles est attribuée, à titre d'hypothèse de travail, la structure de ptérines *para*-dihydrogénées, on obtient 3 paires de ptérines probablement dimères.

Institut de Chimie Organique de l'Université, Zurich

## 169. Synthese von Zwischenprodukten für den Aufbau corticotrop wirksamer Polypeptide

### V. Derivate des Pentapeptids H·Val-Lys-Val-Tyr-Pro·OH ( $\beta^{20-24}$ -Corticotropin) und des diastereoisomeren Peptids H·Val-lys-Val-Tyr-Pro·OH<sup>1)</sup> 2)

von R. Schwyzer, B. Riniker und H. Kappeler

(11. V. 63)

Für die Synthese des corticotrop hochwirksamen Tetracosapeptides  $\beta^{1-24}$ -Corticotropin<sup>3) 4)</sup> wurde das Pentapeptid-Derivat IX, H·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, verwendet, welches die Aminosäuresequenz 20–24 des  $\beta$ -Corticotropins<sup>5)</sup> umfasst. Dieses Derivat haben wir auf verschiedenen Wegen aufgebaut, welche hier ausführlich beschrieben werden sollen<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> IV. Mitteilung: W. RITTEL, Helv. 45, 2465 (1962).

<sup>2)</sup> Die abgekürzte Formulierung folgt den Vorschlägen des 5. Europ. Peptidsymposiums (Oxford, Sept. 1962; Publikation in Vorbereitung). Aminosäuren werden mit drei Buchstaben ihres Trivialnamens abgekürzt (in dieser Arbeit bedeutet zusätzlich: Großschreibung  $\equiv$  natürliche Konfiguration, Kleinschreibung  $\equiv$  unnatürliche [D-] Konfiguration am  $\alpha$ -C-Atom). Aminosäurereste werden durch Anfügen von Bindestrichen (oder Punkten) gekennzeichnet: ein Strich rechts bedeutet Fehlen von Hydroxyl an der  $\alpha$ -COOH-Gruppe, ein Strich links bedeutet Fehlen eines Wasserstoffatoms an der  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe (z. B. H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO–NHCH<sub>2</sub>COOH = Gly-Gly oder H·Gly-Gly·OH). Das Fehlen dieser Partikel an entsprechenden Funktionen der Aminosäureseitenkette wird durch einen oben (oder unten) gerichteten Strich angedeutet; gegebenenfalls können Substituenten an Seitenkettenfunktionen auch in Klammern nach dem Symbol für die Aminosäure erscheinen: CH<sub>3</sub>CO·NH·CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH

Ac  
|  
= Lys oder Lys(Ac). Substituenten werden wie folgt symbolisiert: Z- = Carbobenzyoxy; Ac- = Acetyl; BOC- = *t*-Butyloxycarbonyl; -OBu<sup>t</sup> = *t*-Butoxy.

<sup>3)</sup> H. KAPPELER & R. SCHWYZER, Helv. 44, 1136 (1961).

<sup>4)</sup> R. SCHWYZER in «Protides of the Biological Fluids (PEETERS Ed.)», Elsevier, Amsterdam 1961, S. 27; R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, Chimia 16, 295 (1962); R. SCHWYZER & H. KAPPELER, Helv. 46, 1550 (1963).

<sup>5)</sup> R. G. SHEPHERD, S. D. WILLSON, K. S. HOWARD, P. H. BELL, D. S. DAVIES, S. B. DAVIS, E. A. EIGNER & N. E. SHAKESPEARE, J. Amer. chem. Soc. 78, 5067 (1956).

<sup>6)</sup> Seit unserer ersten, vorläufigen Mitteilung<sup>3)</sup> haben sich auch andere Autoren mit dieser Peptidsequenz beschäftigt; H·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·NH<sub>2</sub> wurde kürzlich von K. STURM, R. GEIGER & W. SIEDEL, Chem. Ber. 96, 609 (1963), beschrieben; Z-Val-Lys(TOS)-Val-Tyr-Pro·OBZL sowie das freie Pentapeptid wurden von J. RAMACHANDRAN & C. H. LI, J. org. Chemistry 28, 173 (1963), hergestellt.

Ein erstes, wichtiges Zwischenprodukt unserer Synthesen war das Tripeptid-Derivat IV, H·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>. Dieses wurde entweder durch Carbodiimid-Kondensation<sup>7)</sup> von Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin (I)<sup>8)</sup> oder durch Azid-Kuppelung<sup>9)</sup> von Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-hydrazid (Ia)<sup>10)</sup> mit L-Prolin-*t*-butylester (II)<sup>1)</sup> hergestellt (Schema 1). Im ersten Falle wird der Tyrosinrest zu etwa 25% racemisiert; das «alles-L»-Tripeptid-Derivat III kann in etwa 60-proz. Ausbeute isoliert werden [das diastereoisomere Peptid-Derivat Z·Val-tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (IIIa) wurde nicht in reiner Form isoliert, sondern nach Hydrolyse der Mutterlaugen von III wurde im Hydrolysat D-Tyrosin nachgewiesen<sup>11)</sup>]; dieses konnte in entsprechenden Hydrolysaten von III nicht aufgefunden werden].

Da die Isomerentrennung leicht auszuführen ist, bietet die Azidkuppelung, welche auch nur eine 60-proz. Ausbeute von kristallisiertem III lieferte, keine wesentlichen Vorteile.

Katalytische Hydrierung von III ergab reines IV.

Der Aufbau des Tripeptid-Derivates IV zum Pentapeptid erfolgte zuerst mittels *p*-Phenylazo-benzyloxy-carbonyl-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysin (VII)<sup>3)</sup>, vgl. Schema 2. Die Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid als Kondensationsmittel führte zur partiellen Racemisierung des carboxylständigen Lys(BOC)-Restes. Wegen seiner leichteren Löslichkeit konnte aber das diastereoisomere Peptid VIII a vom kristallisierten, schwerlöslichen, «alles-L»-Pentapeptid-Derivat VIII, PZ·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, gut abgetrennt werden. Die sterische Einheitlichkeit des letzteren (in bezug auf Lys) wurde durch Hydrierung zu IX und, nach Entfernung von BOC- und -Bu<sup>t</sup>, quantitative Spaltung mit Trypsin erwiesen. Die beiden Spaltprodukte H·Val-Lys·OH und H·Val-Tyr-Pro·OH konnten elektrophoretisch sauber voneinander getrennt werden. Es liess sich auf diesem Wege keine Spur ungespaltenen Pentapeptides H·Val-lys-Val-Tyr-Pro·OH (XIIIa, Schema 3) nachweisen; VIII und IX sind also «alles-L»-Isomere.

Dieser Weg wurde in der Folge zugunsten des in Schema 3 dargestellten Aufbaus verlassen, weil das PZ-Pentapeptid für praktische Zwecke etwas zu schwerlöslich ist. Nach diesem Schema wird das Dipeptid-Derivat XI, Carbobenzoxy-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysin, verwendet. Kondensation mittels Dicyclohexyl-carbodiimid in Acetonitril lieferte 60% des kristallisierten «alles-L»-Derivates Z·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (XII), welches leicht vom ebenfalls kristallisierten (L-D-L-L-L)-Isomeren XIIa abgetrennt werden kann.

Die beiden Isomeren besitzen fast denselben Smp.; Hydrierung entfernt die Carbobenzoxygruppe, wobei IX bzw. IXa entstehen. Aus diesen Verbindungen wurden BOC- und -Bu<sup>t</sup> mittels HCl in Essigester gespalten. Von den entstandenen diastereoisomeren Pentapeptiden (welche sich papierchromatographisch voneinander unterscheiden) ist nur XIII mittels Trypsin spaltbar, XIIIa wird nicht angegriffen.

<sup>7)</sup> J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

<sup>8)</sup> R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. 41, 1273 (1958).

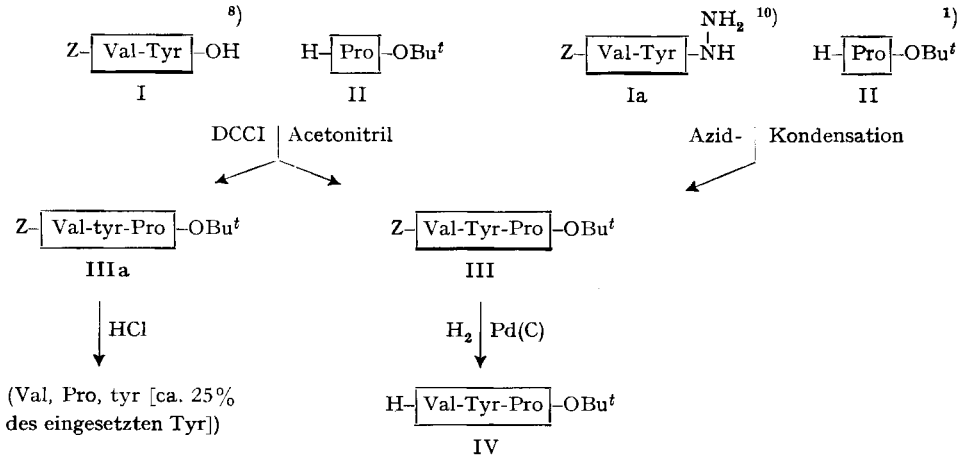
<sup>9)</sup> TH. CURTIUS, Ber. deutsch. chem. Ges. 35, 3226 (1902).

<sup>10)</sup> H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS & I. H. PAGE, J. Amer. chem. Soc. 79, 5697 (1957).

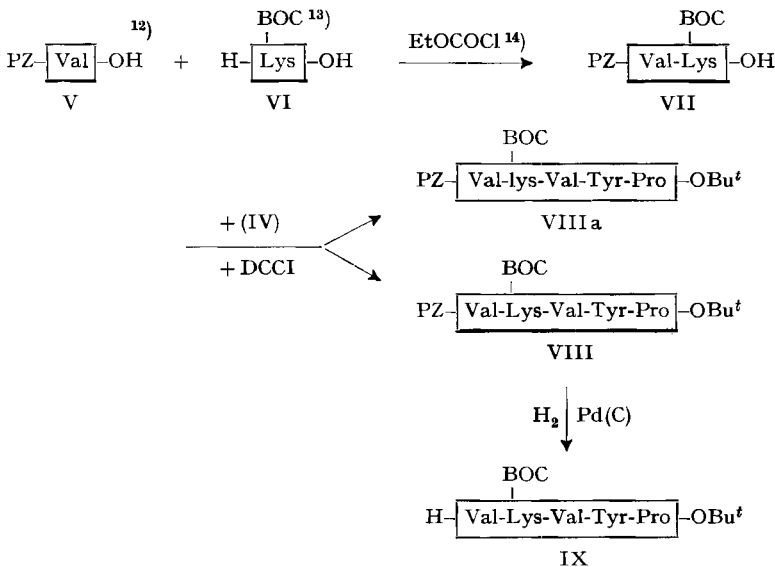
<sup>11)</sup> B. RINIKER & R. SCHWYZER, Helv. 44, 658 (1961).

Eine stereospezifische Synthese von Z-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (XII) wurde durch stufenweisen Aufbau aus dem Tripeptid-Derivat IV über die Tetrapeptid-Derivate XVII und XVIII verwirklicht (Schema 4). Das Endprodukt XII erwies sich als identisch mit der nach Schema 3 erhaltenen Verbindung.

Schema 1. Darstellung des Tripeptid-Derivates IV, Aminosäuresequenz 22–24



Schema 2. Darstellung des Pentapeptid-Derivates IX, Aminosäuresequenz 20–24, über sein N<sup>α</sup>-Phenylazo-benzyloxycarbonyl- (PZ-) Derivat

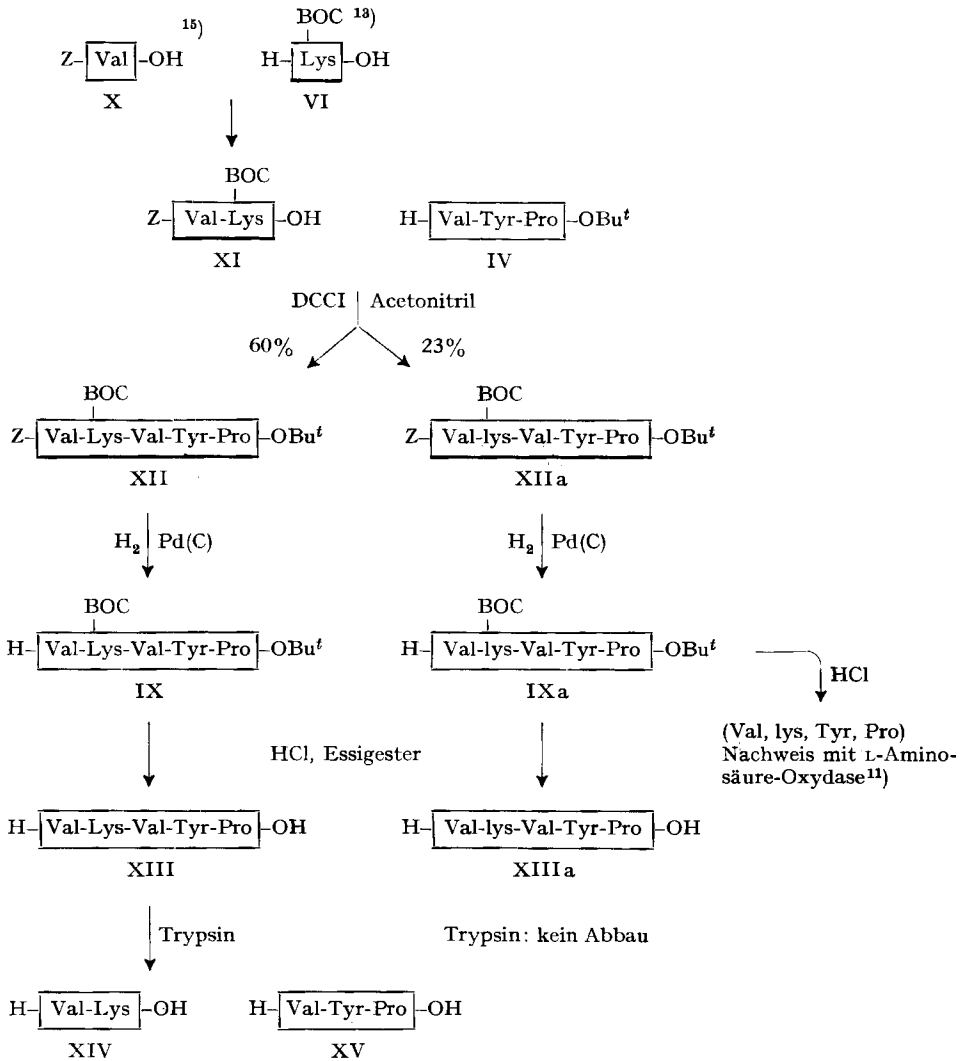


<sup>12)</sup> R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, *Helv. 41*, 491 (1958).

<sup>13)</sup> R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv. 44*, 159 (1961).

<sup>14)</sup> R. A. BOISSONNAS, *Helv. 34*, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* 572, 190 (1951).

Schema 3. Darstellung des Pentapeptid-Derivates IX, Aminosäuresequenz 20–24, über sein N $\alpha$ -Carbobenzoxy-(Z-) Derivat. Trennung der Diastereoisomeren XII und XIIa



Die optische Einheitlichkeit von H·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (IX) wurde zur Sicherheit durch Totalhydrolyse und Abbau der entstandenen Aminosäuren mit L-Aminosäureoxydase<sup>11)</sup> nachgewiesen.

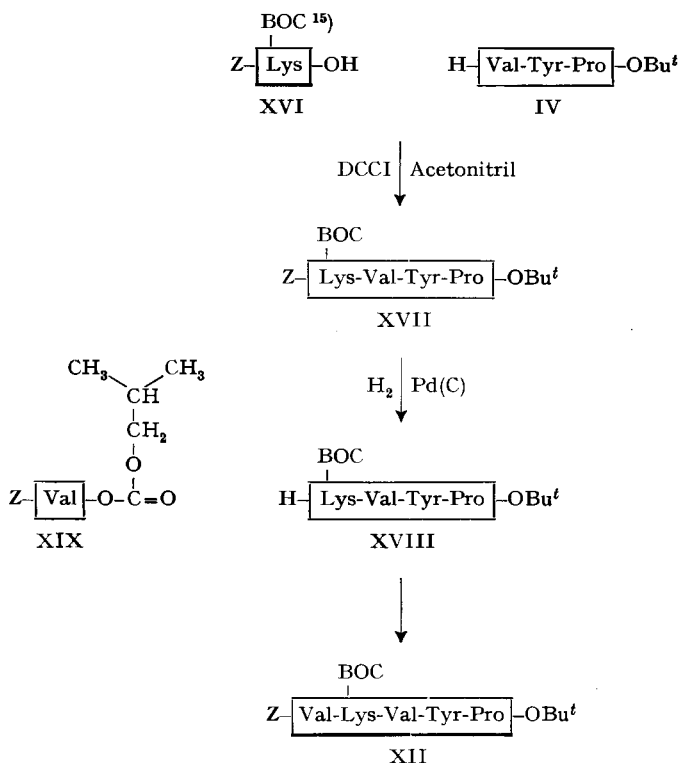
Währenddem die relativ starke Neigung des Tyrosins in der Kombination Val-Tyr zur partiellen Racemisierung während der Carboxyl-Aktivierung bekannt war<sup>16)</sup>, ist die starke Racemisierung des Lys(BOC) (ca. 25%) eher erstaunlich. RITTEL hatte bei der Kondensation von TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH mit H·Arg

<sup>15)</sup> R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).

<sup>16)</sup> B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1760 (1960).

(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro·OBu<sup>t</sup> (mittels Carbodiimid) nur etwa 10–12% Racemisierung beobachtet<sup>1)</sup>. Vermutlich spielt die Verlangsamung der Kondensationsreaktion wegen sterischer Hinderung durch das N-terminale Valin eine gewisse Rolle: in dem hier beschriebenen Beispiel müsste daher das C-terminale Lys(BOC) länger im aktivierten Zustande verharren, was die Möglichkeit der Racemisierung nach irgendeinem Mechanismus (z. B. über Azlactone<sup>17)</sup>) begünstigt.

Schema 4. Darstellung des Pentapeptid-Derivates XII, Aminosäuresequenz 20–24, über das Tetrapeptid-Derivat XVII



Die Analysen wurden in den mikroanalytischen Laboratorien unserer Firma (Leitung: Dr. W. PADOWETZ), die Papierchromatographien und die Dünnschichtchromatographien im Chromatographie-Labor (Dr. R. NEHER und Herr E. VON ARX) ausgeführt, wofür wir bestens danken.

### Experimenteller Teil

Smp. wurden in der Kapillare im Smp.-Apparat nach Dr. TORTOLI (Fa. W. BÜCHL, Flawil) bestimmt und sind nicht korrigiert. Lösungsmittel wurden durchwegs im Wasserstrahl-Vakuum (ca. 10–15 Torr) im Rotationsverdampfer entfernt, sofern nichts anderes angegeben.

Lösungsmittel für Papierchromatographie (PC) und Dünnschichtchromatographie (auf Kieselgel G = DS); Zahlenangaben = Volumenteile, wo nichts anderes angegeben:

40: *n*-Butanol, Äthanol, H<sub>2</sub>O (10:10:5),

43: *t*-Amylalkohol, *iso*-Propanol, H<sub>2</sub>O (10:4:1),

<sup>17)</sup> F. WEYGAND, A. PROX, L. SCHMIDHAMMER & W. KÖNIG, *Angew. Chem.* 75, 282 (1963).

45: *sec*-Butanol, 3-proz. Ammoniak (100:44),

54: *sec*-Butanol, *iso*-Propanol, Chloressigsäure, H<sub>2</sub>O (70 ml : 10 ml : 3 g : 40 ml)

(Die Systeme sind jeweils in Klammern nach den Rf-Werten angegeben).

Der Nachweis auf Chromatogrammen erfolgte jeweils mit REINDEL-HOPPE, Ninhydrin- oder PAULY-Reagens.

Oft wurden Peptid-Derivate mit konz. HCl (45°/45 Min.) behandelt, um vor der Chromatographie Z-, BOC- und Bu<sup>t</sup>-Gruppen zu entfernen (Behandlung mit HCl).

**A. Schema 1.** – III. Z·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, Benzylloxycarbonyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester. – a) Die Lösungen von 4,65 g (27,4 mMol) L-Prolin-t-butylester<sup>1)</sup> in 25 ml Acetonitril und von 11,25 g (27,4 mMol) Z·Val-Tyr·OH (I; Benzylloxycarbonyl-L-valyl-L-tyrosin<sup>8)</sup>) in 100 ml Acetonitril wurden vereinigt, auf 0° gekühlt und mit 6,21 g (30,4 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml Acetonitril versetzt. Nach 15 Std. bei 0° wurde der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff (5,5 g) abfiltriert und die klare Lösung mit 1 ml Eisessig versetzt. Der Ansatz wurde mit viel Essigester verdünnt, nochmals filtriert und bei 0° mit 2 N HCl und 2 N Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Sobald beim Ansäuern der alkalischen Extrakte kein Niederschlag mehr auftrat, wurde die organische Schicht mit Wasser neutral gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand (13,5 g) aus Acetonitril umkristallisiert: 8 g (51,5% d. Th.), Smp. 170–171°.  $[\alpha]_D^{20} = -70,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,015$  in Methanol).

C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (567,66) Ber. C 65,59 H 7,28 N 7,40% Gef. C 65,33 H 7,17 N 7,64%

Nach der Totalhydrolyse mit 7,1 N HCl bei 115° während 15 Std. wurde das entstandene Aminosäuregemisch mit L-Aminosäureoxydase in der üblichen Weise<sup>11)</sup> untersucht: das kristallisierte Tripeptidderivat enthält kein D-Tyrosin, das amorphe Produkt aus der Mutterlauge dagegen sehr erhebliche Mengen (Racemisierung des Tyrosin-Restes beträgt total ca. 25%).

b) 12,9 g Z·Val-Tyr·NHNH<sub>2</sub> (Ia; Benzylloxycarbonyl-L-valyl-L-tyrosin-hydrazid<sup>10)</sup> wurden in einem Gemisch von 60 ml 2 N HCl und 120 ml Dimethylformamid gelöst und nach Kühlen auf –15° mit 7 ml einer 5 N, wässrigen Lösung von NaNO<sub>2</sub> versetzt. Das Gemisch wurde weitere 5 Min. bei –10° belassen und dann in viel Eiswasser gegossen. Das ausgeschiedene Säureazid wurde abfiltriert, in kaltem Essigester gelöst, bei 0° nacheinander mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen und schnell über Magnesiumsulfat getrocknet. In dieser Azid-Lösung (Vol. ca. 300 ml) wurden sofort 5,15 g L-Prolin-t-butylester<sup>1)</sup> aufgelöst. Nach 5 Std. bei 0° und 15 Std. bei 20° wurde die Lösung i. V. auf die Hälfte eingengt, wobei der grösste Teil des Tripeptid-Derivates III auskristallisierte. Es wurde abgentscht und mit Essigester und Benzol gewaschen: 7,95 g (46,5%), Smp. 173–175°. Die Mutterlauge wurde nacheinander mit 10-proz. Weinsäure-Lösung, verd. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen und dann i. V. zur Trockne eingengt. Aus dem öligen Rückstande wurden durch wiederholte Kristallisation aus heissem Acetonitril und aus Methanol-Essigester weitere 2,22 g (13%) Z·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (III), Smp. 173–175°, gewonnen. –  $[\alpha]_D^{20} = -69,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,5$  in Methanol). PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,65 (40); 0,48 (45); 0,71 (54), Nachweis mit PAULY-Reagens.

IV: H·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, L-Valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester: 4,83 g (8,5 mMol) Z·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (III) wurden in 150 ml Methanol in Gegenwart von 500 mg Palladium-Kohle (10% Pd) innerhalb 1 Std. aushydriert (freigesetztes CO<sub>2</sub> wurde in einer zweiten Schüttelente über KOH aufgefangen). Nach Abfiltrieren des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittels i. V. hinterblieben 3,6 g (98%) harziges Material:  $[\alpha]_D^{20} = -47,4^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,4$  in Methanol); DS: Rf = 0,85 (54); 0,90 (45); 0,90 (43), PC: Rf = 0,87 (40); 0,92 (45); 0,85 (54), PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,65 (40); 0,48 (45); 0,71 (54), alles einheitliche Flecken (Ninhydrin, PAULY).

**B. Schema 2.** – VII: PZ·Val-Lys(BOC)·OH, p-Phenylazo-benzylloxycarbonyl-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysin: Eine Lösung von 4,75 g (13,4 mMol) p-Phenylazo-benzylloxycarbonyl-L-valyl-L-lysin<sup>12)</sup> in 65 ml abs. Dioxan wurde mit 3,45 ml (14,5 mMol) Tributylamin und 1,38 ml (14,5 mMol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt (dabei wird die Reaktionsmischung nur soweit abgekühlt, dass nur ein relativ kleiner Teil des Dioxans gefroren ist): Umsetzungsdauer 15 Min. Zu dieser Lösung des gemischten Anhydrids wird unter kräftigem Rühren die auf +10° gekühlte Lösung von 4 g (16,2 mMol) N<sup>ε</sup>-t-Butoxycarbonyl-L-lysin<sup>13)</sup> und 2,45 ml Triäthylamin in 26,5 ml Wasser gegossen. Man lässt die Mischung 30 Min. bei 20° reagieren, dampft dann das Dioxan i. V. ab und versetzt die stark konzentrierte Reaktionslösung mit 70 ml Wasser und 70 ml 10-proz. Zitronensäure-Lösung. Das Reaktionsprodukt fällt dabei als zähes Harz aus; beim Verreiben mit Äther

wird es kristallin und kann aus Essigester umkristallisiert werden; 5,48 g (70%) orangefarbene Kristalle, Smp. 167–169°. Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol:  $\lambda_{max}$ : 230  $m\mu$  ( $\epsilon = 13400$ ); 322  $m\mu$  ( $\epsilon = 23000$ ).

$C_{30}H_{41}O_7N_6$  (583,67) Ber. C 61,75 H 7,08 O 19,19% Gef. C 61,88 H 7,36 O 19,42%

VIII: *PZ·Val-Lys(BOC)·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, Phenylazo-benzyloxycarbonyl-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester*: Die Lösungen von 10,36 g (17,7 mMol) *PZ·Val-Lys(BOC)·OH* (VII) in 63 ml Dimethylformamid und von 7,6 g (17,7 mMol) *H·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>* (IV) in 76 ml Dimethylformamid wurden vermischt, auf 0° gekühlt und mit 4,05 g (19,5 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 3 Tagen bei 0° wurde von auskristallisiertem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit 0,5 ml Eisessig versetzt und i. V. auf ein kleines Volumen eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und nacheinander mit 0,2N Ammoniak, Wasser, 10-proz. Zitronensäurelösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit  $Na_2SO_4$  und Verdampfen i. V. verblieben 17,2 g rohes, orangefarbenes Reaktionsprodukt.

Zur Reinigung wurde es in  $CHCl_3$  gelöst und auf eine Säule von 570 g mit 10% Wasser inaktiviertem Silikagel aufgezogen. Ein Gemisch von  $CHCl_3$ -Essigester (2:1) eluierte die Hauptmenge (12,63 g) des Pentapeptidderivates VIII, welches papierchromatographisch aber noch leicht verunreinigt war (PC und DS siehe unten). Ein zweites Chromatogramm ergab die reine Verbindung, welche aus Acetonitril umkristallisiert wurde: 8,8 g (50%) optisch reines Produkt (siehe unten: Trypsinspaltung), Smp. 174–179°.  $[\alpha]_D^{20} = -59,8^\circ \pm 9^\circ$  ( $c = 0,137$  in Methanol). Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol:  $\lambda_{max} = 227 m\mu$  ( $\epsilon = 20700$ ); 322  $m\mu$  ( $\epsilon = 21000$ ). PC: Rf = 0,23 ( $HCCl_3$ -Aceton, 95:5 Vol); 0,60 (Benzol-Aceton, 1:1 Vol). DS: 0,30 ( $HCCl_3$ -Aceton, 7:3 Vol); 0,65 (Benzol-Aceton, 1:1 Vol); 0,65 (Essigester); 0,75 (Dioxan- $H_2O$ , 9:1). Nachweis mit Eigenfarbe und unter UV.-Licht.

$C_{53}H_{74}O_{11}N_8$  Ber. C 63,71 H 7,46 O 17,61 N 11,21%  
(999,24) Gef. „ 63,57 „ 7,52 „ 17,39 „ 11,26%

C. Schema 3. – XI: *Z·Val-Lys(BOC)·OH, Carbobenzoxy-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysine*: 25,1 g *Z·Val·OH*<sup>1b</sup>) und 15,4 ml Triäthylamin wurden in 500 ml absolutem Dioxan gelöst und auf +12° abgekühlt. Während 4 Min. wurden nun 13,1 ml Chlorameisensäure-isobutylester zugetropft (Rühren). Nach weiteren 10 Min. bei +12° wurden eine auf 0° gekühlte Lösung von 19,7 g *N<sup>ε</sup>-t-Butoxycarbonyl-L-lysine*<sup>13</sup>) und 11,9 ml Triäthylamin in 250 ml Wasser zugegeben. Die entstandene, klare Lösung wurde 10 Min. bei 10° und 4 Std. bei 20° aufbewahrt, dann auf 150 ml eingengt, mit 50 ml Wasser und (bei 0°) mit 27 g Zitronensäure in 50 ml Wasser vermischt. Das so ausgefällte schmierige Reaktionsprodukt wurde mit 500 ml Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde mit Wasser neutral gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Essigester gelöst und mit Benzol gefällt: 30,9 g Rohprodukt, Smp. 103–112°. Kristallisation aus Essigester-Benzol: 28,8 g (75%) *Z·Val-Lys(BOC)·OH*, Smp. 107–109°.  $[\alpha]_D = -9^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,1$  in Methanol). PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,20 (45); 0,32 (54).

$C_{24}H_{37}O_7N_3$  (479,56) Ber. C 60,11 H 7,78 N 8,76% Gef. C 60,24 H 7,73 N 8,78%

XII: *Z·Val-Lys(BOC)·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, Benzyloxycarbonyl-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester*: 2,3 g (4,8 mMol) *Z·Val-Lys(BOC)·OH* (XI) und 1,73 g (5,1 mMol) *H·Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>* (IV) wurden in 25 ml Acetonitril unter Rühren mit 1,06 g (5,1 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Die Ausscheidung von Dicyclohexylharnstoff beginnt sofort; später scheidet sich auch das Pentapeptid-Derivat aus. Die Reaktionsmischung wird nach 15 Std. bei 20° mit 25 ml Benzol verrührt und (nach Ausfällung des Reaktionsproduktes) filtriert. Der unlösliche Rückstand wird noch zweimal mit je 5 ml Benzol-Acetonitril (1:1 Vol) und mit Benzol gewaschen. Der feste Rückstand (3,5 g) wird mit 10 ml Dimethylformamid unter schwachem Erwärmen digeriert. Beim Abkühlen auf 0° scheiden sich 1,1 g Dicyclohexylharnstoff aus. Nach Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels wird das Pentapeptidderivat aus 50 ml Aceton umkristallisiert: 2,1 g, Smp. 158–161°. Aufarbeitung aller Benzol-Acetonitril-Mutterlaugen in der üblichen Weise (Essigester, Waschen mit Zitronensäurelösung, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser) und Kristallisation aus Aceton ergab nochmals 500 mg. Umkristallisieren aus Aceton: 2,58 g (60%), Smp. 162–165°. PC (nach HCl): Rf = 0,40 (40); 0,36 (45); 0,47 (54).  $[\alpha]_D^{20} =$

$-72,3^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,99$  in Methanol). Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol:  $\lambda_{max} = 280 \text{ m}\mu$  ( $\epsilon = 1650$ ).

$C_{47}H_{70}O_{11}N_6$  (895,13) Ber. C 63,07 H 7,88 N 9,39% Gef. C 63,05 H 7,94 N 9,25%

Nach katalytischer Hydrierung und Totalhydrolyse (6N HCl, 21 Std.,  $115^\circ$ ) wurden die freigesetzten Aminosäuren mit L-Aminosäureoxydase behandelt<sup>11</sup>). Lys, Val und Tyr wurden vollständig abgebaut.

**XIIa:** *Z-Val-lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OBu<sup>t</sup>, Carbobenzoxy-L-valyl-(N<sup>e</sup>-t-butoxycarbonyl)-D-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester*: Aus einem grossen Ansatz von 12,9 g Z-Val-Lys(BOC)·OH, 11,44 g H-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> und 6,55 g Dicyclohexyl-carbodiimid in Acetonitril wurde das «alles-L» Pentapeptidderivat nach XII isoliert. Das ursprüngliche Filtrat des Reaktionsgemisches (Benzol und Acetonitril enthaltend) wurde bis fast zur Trockne eingengt, in heissem Benzol aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Fällung (7,06 g) wurde wiederholt aus Acetonitril und aus Methanol-Benzol-Petroläther umkristallisiert, wobei jedesmal die schwerer lösliche «alles-L»-Form abgetrennt wurde.

Der ganze Ansatz liefert insgesamt 14,2 g (60%) des «alles-L» Pentapeptid-Derivates XII sowie 5,45 g (23%) des (L-D-L-L-L)-Diastereoisomeren XIIa mit D-Lysin, Smp.  $165-166^\circ$  (Misch-Smp. ca.  $150^\circ$ ). Das neue Isomere XIIa weist noch folgende Eigenschaften auf:  $[\alpha]_D = -39,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol). PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,56 (40); 0,36 (45); 0,48 (54); es unterscheidet sich vom XII also hauptsächlich im System 40.

$C_{47}H_{70}O_{11}N_6$  Ber. C 63,07 H 7,88 O 19,66 N 9,39%  
(895,13) Gef. „ 63,09 „ 7,96 „ 19,57 „ 9,20%

Nach katalytischer Hydrierung und Totalhydrolyse (6N HCl, 21 Std.,  $115^\circ$ ) wurden die freigesetzten Aminosäuren mit L-Aminosäureoxydase behandelt<sup>11</sup>). Lysin blieb vollständig erhalten, Val und Tyr wurden abgebaut.

**IX:** *H-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OBu<sup>t</sup>, L-Valyl-(N<sup>e</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester*: 4,5 g (5 mMol) Z-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (XII) wurden in 150 ml Methanol in Gegenwart von 500 mg Palladium-Kohle (10% Pd) hydriert. Nach 1 Std. kam die Wasserstoffaufnahme zu Ende (CO<sub>2</sub> wurde in einer zweiten Schüttelente über KOH aufgefangen). Der Katalysator wurde abfiltriert, mit viel Methanol gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates i. V. verdampft: 3,7 g (97%) farbloses Harz.

*Trypsin-Spaltung von IX:* Eine Probe des Hydrierungsproduktes wurde zur Entfernung der *t*-Butoxycarbonyl- und der *t*-Butyl-Gruppen mit HCl in Essigester behandelt und dann in der üblichen Weise mit Trypsin bei  $37^\circ$  inkubiert. Proben, die nach 6, 12 und 24 Std. entnommen wurden, waren alle in zwei Teile gespalten (Trennung elektrophoretisch, pH = 6,3, ca. 50 V/cm):

|                          |                               |  |
|--------------------------|-------------------------------|--|
| H·Val-Lys·OH             | 17 cm (Laufstrecke in 1 Std.) | } identisch mit aus (XI) und (IV)<br>} gewonnenem Vergleichsmaterial |
| H·Val-Tyr-Pro·OH         | 2 cm                          |  |
| H·Val-Lys-Val-Tyr-Pro·OH | 9 cm                          |  |

Das diastereomere Peptid H·Val-lys-Val-Tyr-Pro·OH wurde unter identischen Bedingungen von Trypsin nicht angegriffen.

Die optische Einheitlichkeit des PZ-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (VIII) in bezug auf Lysin wurde in ähnlicher Weise sichergestellt (die diastereomere Verbindung wurde in diesem Falle nicht isoliert).

**IX:**  $[\alpha]_D = -69,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,7$  in Methanol). PC: Rf = 0,92 (40); 0,94 (45); 0,94 (54).

$C_{38}H_{64}O_9N_6$  (760,95) Ber. C 61,55 H 8,48 N 11,05% Gef. C 61,14 H 8,42 N 11,16%

**D. Schema 4. - XVII:** *Z-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OBu<sup>t</sup>, Carbobenzoxy-(N<sup>e</sup>-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester*: 19,15 g Z-Lys(BOC)·OH (XVI)<sup>18</sup> und 21,8 g H-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (IV) wurden in 200 ml Acetonitril gelöst und mit 11,4 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Zuerst wurde die Mischung kurze Zeit mit Eis gekühlt, dann 15 Std. bei  $20^\circ$  aufbewahrt. Überschüssiges Carbodiimid wurde mit 1 ml Eisessig zerstört; darauf wurde das Gemisch auf  $0^\circ$  gekühlt und durch Filtration vom Dicyclohexylharnstoff abgetrennt. Das Filtrat wurde zur Trockne eingengt und der amorphe Rückstand einmal aus Essigester-Petroläther und zweimal aus Benzol-Petroläther umgefällt. Trocknen bei  $45^\circ$  und 0,001 Torr: 37,94 g (91,5%) amorphes



Tetrapeptid-Derivat XVIII, Smp. ca. 110°.  $[\alpha]_D = -62,3^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,9$  in Methanol). PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,40 (40); 0,28 (45).

$C_{42}H_{61}O_{10}N_5$  (795,98) Ber. C 63,38 H 7,72 N 8,80% Gef. C 63,51 H 7,80 N 9,05%

XVIII: *H*·Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, (N<sup>ε</sup>-*t*-Butoxycarbonyl)-L-Lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-*t*-butylester: 36,2 g *Z*·Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (XVII) wurden in 100 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 3 g Palladium-Kohle (10% Pd) in der Schüttelente unter Absorption von CO<sub>2</sub> hydriert. Nach beendigtem H<sub>2</sub>-Verbrauch wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde pulverisiert und bei 45° und 0,001 Torr getrocknet: 29,6 g (98%) Tetrapeptid-Derivat XVIII, amorph, Smp. ca. 95–100°.  $[\alpha]_D = -61,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,0$  in Methanol). PC: Rf = 0,86 (40); 0,94 (45); 0,93 (54).

$C_{34}H_{55}O_8N_5$  (661,82) Ber. C 61,70 H 8,38 N 10,58% Gef. C 61,49 H 8,42 N 10,56%

XII: *Z*·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, *stufenweiser Aufbau (Schema 4)*: 8,73 g *Z*·Val·OH<sup>15</sup> und 5,09 ml Triäthylamin wurden in 85 ml abs. Essigester gelöst und auf –10° gekühlt. Unter Rühren wurden dazu während 2 Min. bei –10° 4,57 ml Chlorameisensäure-isobutylester getropft und das Gemisch weitere 15 Min. bei –10° gerührt. Darauf wurde eine Lösung von 21,92 g *H*·Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (XVIII) in 70 ml Essigester während 5 Min. bei –5° zugetropft. Nach 30 Min. bei 0° und 1 Std. bei 20° wurde das Reaktionsgemisch mit Essigester verdünnt, nacheinander mit H<sub>2</sub>O, 10-proz. Weinsäure-Lösung, verd. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 10-proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft: 29,9 g amorphes Rohprodukt. Dieses wurde aus 300 ml Acetonitril kristallisiert. Durch Suspendieren des fein kristallinen Materials in siedendem Acetonitril und Kühlen auf 0° kann es von kleinen Mengen leichter löslicher Verunreinigungen befreit werden: 22,55 g (76%) Pentapeptid-Derivat XII, feine Nadelchen, Smp. 162–165°.  $[\alpha]_D = -71,4^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,9$  in Methanol). PC (nach HCl-Behandlung): Rf = 0,40 (40); 0,36 (45); 0,47 (54).

$C_{47}H_{70}O_{11}N_6$  Ber. C 63,07 H 7,88 O 19,66 N 9,39%  
(895,13) Gef. „ 62,97 „ 7,75 „ 19,64 „ 9,56%

#### SUMMARY

Various syntheses of L-Valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-proline *t*-butyl ester (IX) are described. Condensations involving dicyclohexyl carbodiimide and either *p*-phenylazo-benzyloxycarbonyl-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysine (VII), carbobenzoxy-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysine (XI), or carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosine (I) produce about 25 per cent racemisation of the C-terminal amino acids. Carbobenzoxy-L-valyl-(N<sup>ε</sup>-*t*-butoxycarbonyl)-D-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-proline *t*-butyl ester (XIIa) was isolated as a crystalline compound with the same m.p. as the «all-L»-isomer. Configurations were determined by the action of trypsin on lysyl peptides and by the action of L-amino-acid oxidase on acid hydrolysates<sup>11</sup>).

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung