

Erich Wünsch, Anton Zwick und Angelo Fontana*)

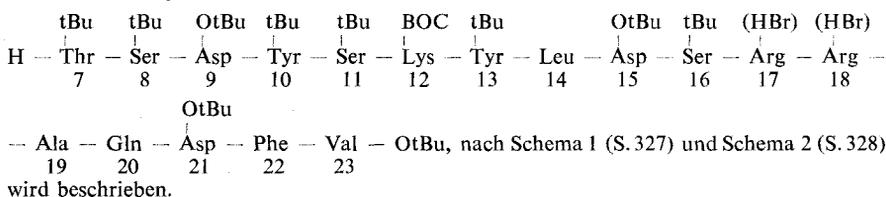
Zur Synthese des Glucagons, XV¹⁾

Darstellung der Sequenzen 7–15 und 7–23 des Glucagons

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

(Eingegangen am 26. Juli 1967)

Die Synthese der am Aminoende freien, sonst allseits geschützten Heptadecapeptid-Sequenz 7–23 des Glucagons,



In zwei vorausgegangenen Mitteilungen²⁾ hatten wir die Synthese von zwei Teilstücken des Glucagons — die entsprechend geschützten Sequenzen 1–8 bzw. 9–23 — beschrieben. Unseren Versuchen, die Peptide BOC-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-NHNH₂ [1-8b] und H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [9-23c] auf dem durch die Kopfkomponeute vorgezeichneten Wege nach dem Azid-Verfahren zum Tricosapeptid-Derivat mit der Glucagon-Sequenz 1–23 zu vereinen, war jedoch kein Erfolg beschieden. Auch bei Anwendung eines fünffachen Überschusses an der „Kopfkomponeute“ [1-8b] konnten wir nur maximal 2–3% Verknüpfungsprodukt nachweisen.

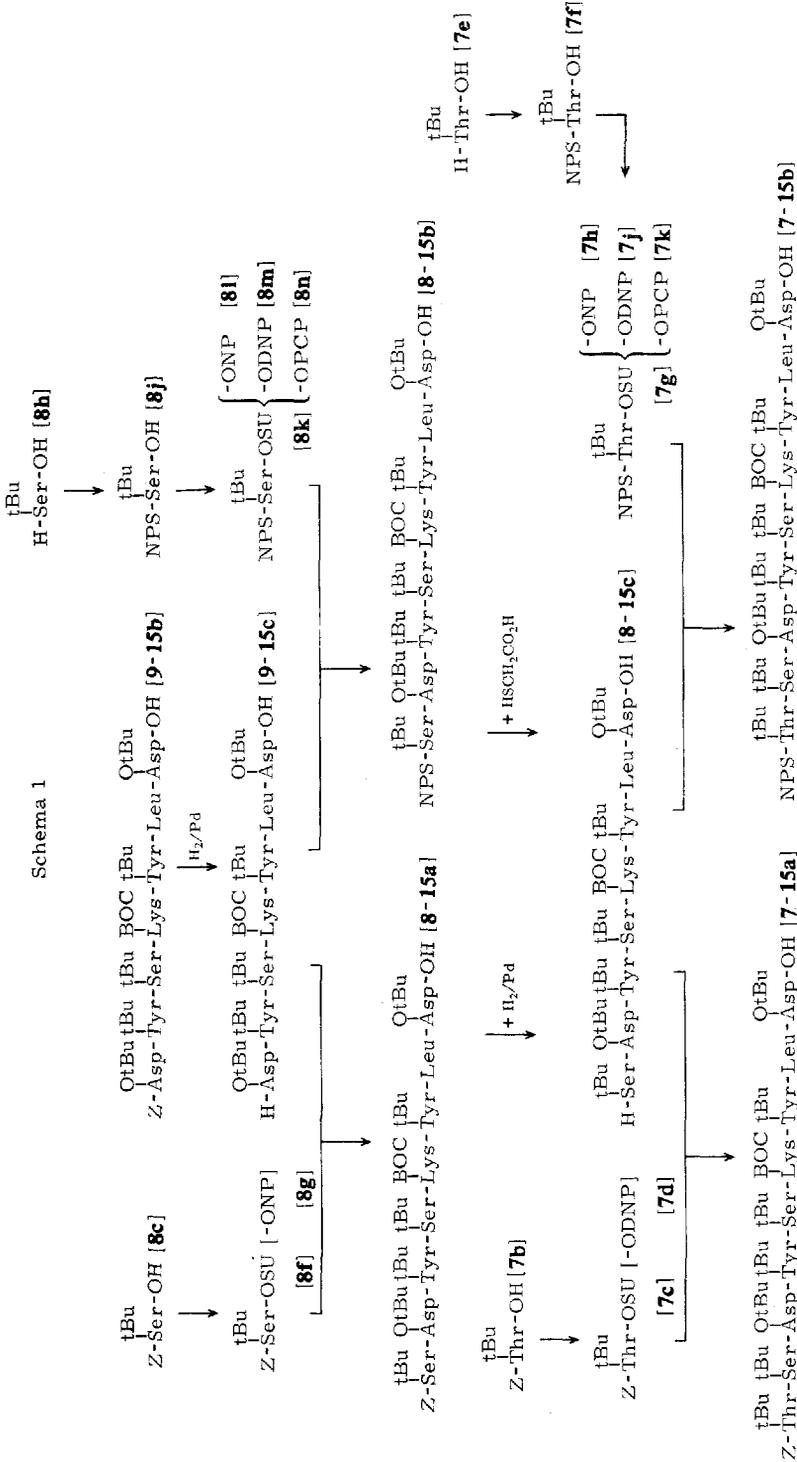
Zur Synthese der Glucagon-Sequenz 1–23 — der im Hinblick auf die Befunde Bromers³⁾, nach denen die Sequenz 1–22 volle biologische Hormon-Aktivität besitzen soll, Bedeutung zukommt — sind wir unter Benützung des uns in größerer Menge zur Verfügung stehenden Teilstückes [9-23b] einen neuen Weg gegangen. Durch Anbau von Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-OH [7-8d], auf übliche Weise aus Z-Thr(tBu)-OH [7b] und H-Ser(tBu)-OCH₃ [8e] erhalten, an den Pentadecapeptidester [9-23c] nach

*) Gegenwärtige Anschrift: Istituto di Chimica Organica dell' Università, Padova, Italien.

¹⁾ XIV. Mittel.: E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. 100, 820 (1967).

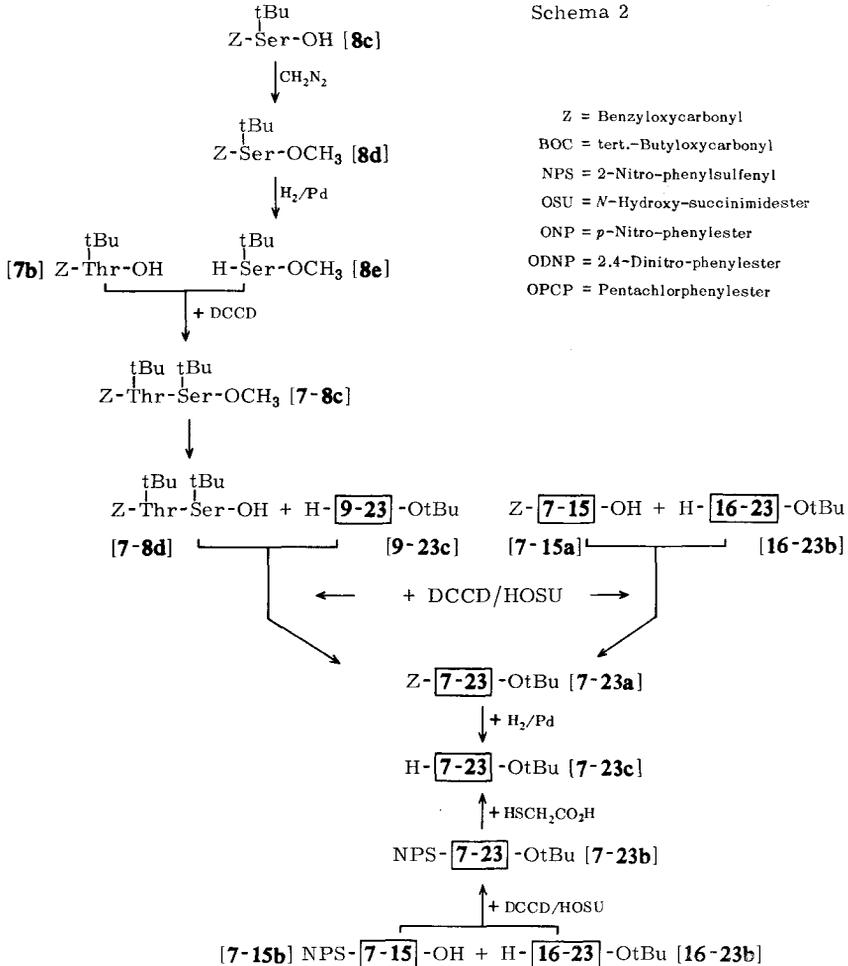
²⁾ 2a) E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 99, 101 (1966); 2b) E. Wünsch, A. Zwick und G. Wendlberger, Chem. Ber. 100, 173 (1967).

³⁾ W. W. Bromer und B. J. Remus, Abstract 6th Internat. Congress of Biochemistry, New York 1964, Teil II-24.



Abkürzungen siehe Schema 2

dem „Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren“⁴⁾ gelangten wir zum *N*^z-Benzyl-oxycarbonyl-heptadecapeptidester [7-23a]; anschließende hydrogenolytische Entacylierung von [7-23a] ergab den freien Heptadecapeptidester [7-23c] in fast quantitativer Ausbeute (s. Schema 2). Dessen Verknüpfung mit einem geeigneten *N*^z-Acylhexapeptid der Glucagon-Sequenz 1–6 sollte größere Erfolgchancen besitzen als die oben genannte Azid-Synthese aus [1-8b] und [9-23c] (s. dazu die nachstehende XVI. Mitteil.).



Im Hinblick auf die von uns letztlich als Ziel angestrebte Totalsynthese des Glucagons haben wir zur Darstellung von H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [7-23c] noch zwei weitere Wege beschriften:

⁴⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **99**, 110 (1966); F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21 b**, 426 (1966).

Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [9-15b]⁵⁾ wurde in fast quantitativer Ausbeute zum freien Heptapeptid [9-15c] hydrogenolytisch entacyliert, an dieses in „stufenweiser“ Synthese Z-Ser(tBu)-OH bzw. NPS-Ser(tBu)-OH und Z-Thr(tBu)-OH bzw. NPS-Thr(tBu)-OH unter Verwendung der „aktivierten“ Ester dieser Aminosäure-Derivate [8f-n]⁶⁾ bzw. [7c-k]⁶⁾ zum *N*^α-Benzyl-oxycarbonyl- bzw. *N*^α-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-nonapeptid [7-15a bzw. b] angebaut (s. Schema 1).

Die Verknüpfung der *N*^α-acylierten Nonapeptide [7-15a bzw. b] mit dem Octapeptid-*tert.*-butylester [16-23b]⁷⁾ zum *N*^α-Benzyl-oxycarbonyl-heptadecapeptidester [7-23a] bzw. *N*^α-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-heptadecapeptidester [7-23b] in 71- bzw. 85proz. Ausbeute gelang nach dem Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren.

[7-23a] wurde schließlich durch katalytische Hydrogenolyse in den freien Heptadecapeptid-*tert.*-butylester [7-23c] übergeführt. Die Abspaltung der Nitrophenylsulfenyl-Schutzgruppe aus [7-23b] ließ sich mittels 80proz. Thioglykolsäure vollziehen; [7-23c] konnte in chromatographisch reiner Form als Thioglykolat isoliert werden (s. Schema 2). Da jedoch die Freisetzung von [7-23c] aus seinem Salz nur unter großem Aufwand und erheblichen Substanz-Verlusten möglich war, kommt einer Herstellung des „amino-freien“ Heptadecapeptid-*tert.*-butylesters [7-23c] auf diesem Wege keinerlei Bedeutung zu.

Mit der geglückten Darstellung von NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [7-15b] hatten wir nunmehr auch eine zur Synthese der Sequenz 7—29 geeignete Kopfkomponeute zur Hand (s. dazu die nachstehende XVII. Mittel.).

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir wiederum für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung dieser und der folgenden Arbeiten zu höchstem Dank verpflichtet.

Unseren technischen Assistenten Fräulein *B. Scherer* und Herrn *O. Kraus* (präparative Arbeiten) sowie Fräulein *R. Scharf* (analytische Arbeiten) danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leitung *W. Beck*) ausgeführt.

Beschreibung der Versuche

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

1. *L-Asparagyl*(β -*tert.*-butylester)-*O-tert.*-butyl-*L-tyrosyl-O-tert.*-butyl-*L-seryl-N^ε-tert.*-butyloxycarbonyl-*L-lysyl-O-tert.*-butyl-*L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- β -tert.*-butylester [9-15c]: 200 g (141 mMol) *Z-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [9-15b]⁵⁾ in 2000 ccm Dimethylformamid/95proz. Methanol (1:1) und 3 ccm Eisessig werden bei 40° wie üblich 72 Std. hydriert. Die Reaktionsmischung wird auf dem Wasserbad erwärmt, vom Katalysator abfiltriert und in der Kälte der Kristallisation

⁵⁾ *E. Wünsch* und *A. Zwick*, Chem. Ber. **99**, 105 (1966).

⁶⁾ NPS-Derivate s.: *E. Wünsch* und *A. Fontana*, Chem. Ber. **101**, 323, (1968), vorstehend.

⁷⁾ *E. Wünsch* und *G. Wendlberger*, Chem. Ber. **100**, 160 (1967).

überlassen. Das erhaltene Produkt wird mit Äthanol digeriert und i. Vak. getrocknet. Chromatographisch rein in n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30) bzw. in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Schmp. über 250°; $[\alpha]_D^{20}$: $-3.5 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+4.6^\circ$ ($c = 1.4$; in 80proz. Essigsäure). Ausb. 176.4 g (95%).

$C_{66}H_{106}N_8O_{17} \cdot H_2O$ (1301.7) Ber. C 60.90 H 8.36 N 8.61 Gef. C 60.82 H 8.42 N 8.61

Nach Trocknen bei 90°/10⁻³ Torr wird die wasserfreie Substanz erhalten.

$C_{66}H_{106}N_8O_{17}$ (1283.6) Ber. C 61.76 H 8.32 N 8.73 Gef. C 61.78 H 8.40 N 8.73

2. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-serin-[N-hydroxy-succinimidester]* [8f]: 53.17 g *Z-Ser(tBu)-OH*⁵⁾ [8c] und 20.72 g *N-Hydroxy-succinimid*⁸⁾ in 600 ccm Dioxan/Tetrahydrofuran (5 : 1) werden bei 0° mit 37.14 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und die Reaktionsmischung 5 Stdn. bei 0° gerührt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemp. filtriert man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft anschließend das Filtrat i. Vak. ein; fast farbloses Öl. Chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Essigsäure (3 : 2 : 1) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Ausb. quantitativ.

3. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^e-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [8-15a]

a) 8.21 g (6.32 mMol) *H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [9-15c] werden in 100 ccm Dimethylformamid mit 0.89 ccm *Triäthylamin* gelöst und bei Raumtemp. unter Rühren mit 3.42 g (8.2 mMol) *Z-Ser(tBu)-ONP* [8g]⁵⁾ versetzt. Nach 48stdg. Rühren wird die Reaktionsmischung mit 3.8 ccm Eisessig versetzt, anschließend i. Vak. eingengt, der erhaltene Rückstand mit verd. Citronensäure-Lösung behandelt, auf das Filter gebracht und zunächst mit Wasser und dann mit Diäthyläther sorgfältig gewaschen. Nach Umkristallisieren aus 90proz. Methanol und Trocknen bei 80°/10⁻³ Torr Schmp. 208–209°; $[\alpha]_D^{20}$: $-12.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -17.5° ($c = 1$; in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30) bzw. in n-Butanol/Wasser/Eisessig (6 : 2 : 2). Ausb. 8.75 g (88%).

$C_{81}H_{125}N_9O_{21} \cdot 1/4 H_2O$ (1565.5) Ber. C 62.15 H 8.08 N 8.05 Gef. C 62.06 H 8.11 N 8.01

b) 171.5 g (133.5 mMol) *Heptapeptid* [9-15c] in 2.5 l Dimethylformamid und 18.5 ccm *Triäthylamin* werden mit 62.7 g (160 mMol) öligem *Z-Ser(tBu)-OSU* [8f] in 100 ccm Dimethylformamid, wie unter 3a) beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Schmp. 203–205°; $[\alpha]_D^{20}$: $-12.4 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -17.0° ($c = 1$; in Methanol). Ausb. 205 g (97.5%).

4. *2-Nitro-phenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^e-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [8-15b]: 2.57 g (2 mMol) *H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [9-15c] in 25 ccm Dimethylformamid werden mit 0.28 ccm *Triäthylamin* und 0.98 g (2.4 mMol) *NPS-Ser(tBu)-OSU* [8k]⁶⁾ versetzt; die Reaktionsmischung wird bei Raumtemp. 15 Stdn. gerührt und anschließend i. Vak. auf die Hälfte des Volumens eingengt. Das auf Zugabe von 500 ccm sehr verd. Citronensäure-Lösung abgeschiedene feste Produkt wird gut verrieben, auf das Filter gebracht und gut mit Citronensäure-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen i. Vak. über P₂O₅ wird das erhaltene *Octapeptid-Derivat* in der erforderlichen Menge Dimethylformamid gelöst, die Lösung in viel Diäthyläther eingegossen und die abfiltrierte Fällung bei 25°/10⁻³ Torr getrocknet; Schmp. 227° (Zers.); $[\alpha]_{578}^{20}$: -9.7° ($c = 0.7$; in Dimethylformamid). Chromatographisch

⁸⁾ E. Wünsch und E. Jaeger, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **346**, 301 (1966).

rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30) bzw. in n-Propanol/Essigester/Wasser (4 : 3 : 3) und in Chloroform/Methanol (7 : 3). Ausb. 2.45 g (77.5%).

$C_{79}H_{122}N_{10}O_{21}S$ (1579.9) Ber. C 60.09 H 7.75 N 8.87 O 21.28 S 2.02
Gef. C 59.90 H 7.91 N 8.69 O 21.27 S 1.79

(Ähnlich gute Ergebnisse erhält man bei der Verwendung der aktiven Ester NPS-Ser(tBu)-ONP [8j], NPS-Ser(tBu)-ODNP [8m] und NPS-Ser(tBu)-OPCP [8n].)

5. *O-tert.-Butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [8-15c]

a) 50 g (32 mMol) *Z-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [8-15a] in 800 ccm Dimethylformamid/95proz. Methanol (1 : 1) und 3 ccm Essigsäure werden bei 45° wie üblich hydriert. Durch kurzes Erhitzen auf dem Wasserbad wird das ausgefallene Produkt in Lösung gebracht, noch heiß vom Katalysator filtriert und das Filtrat anschließend mehrere Std. im Kühlschrank bei -5° stehengelassen. Das abgeschiedene Material wird abgesaugt, mit Methanol gewaschen und über P₂O₅ i. Vak. getrocknet: Schmp. > 250°; $[\alpha]_D^{20}$: $-3.9 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -4.5° ($c = 1$; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (2 : 2 : 1) bzw. in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 40.9 g (80%).

$C_{73}H_{119}N_9O_{19} \cdot 1 H_2O$ (1444.8) Ber. C 60.69 H 8.44 N 8.73 O 22.10
Gef. C 60.79 H 8.58 N 8.73 O 21.91

b) 0.5 g (0.32 mMol) *NPS-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [8-15b] werden in 4 ccm Thioglykolsäure (80%, Merck) unter leichtem Erwärmen gelöst und dann 60 Min. bei Raumtemp. stehengelassen. Durch Zusatz von Diäthyläther fällt ein gallertiges Produkt aus; es wird abfiltriert, mit Petroläther gewaschen, das erhaltene weiße Pulver mit siedendem Methanol digeriert und anschließend bei 80°/10⁻³ Torr über Nacht getrocknet: Schmp. > 250°; $[\alpha]_D^{20}$: $-4.3 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -5.0° ($c = 1$; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2) bzw. in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 0.32 g (69%).

6. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-[N-hydroxy-succinimidester]* [7c]: 5.0 g (10 mMol) *Z-Thr(tBu)-OH·DCHA* [7b·DCHA]⁹⁾ werden in 100 ccm Äthylacetat suspendiert und bei 0° unter Rühren mit Citronensäure-Lösung (Überschuß) bis zur klaren Lösung versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Zu dieser Lösung werden bei 0° unter Rühren 1.15 g (10 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* und 2.06 g (10 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei 0° nachgerührt, dann vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert, i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand in Diäthyläther aufgenommen, von geringen Mengen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung erneut i. Vak. eingedampft: Öl. Ausb. quantitativ.

7. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-[2,4-dinitro-phenylester]* [7d]: 5.0 g (10 mMol) *Z-Thr(tBu)-OH·DCHA* [7b·DCHA]⁹⁾, in 150 ccm Äthylacetat suspendiert, werden bei 0° unter Rühren mit verd. Citronensäure-Lösung bis zur vollständigen Lösung behandelt. Die abgetrennte organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. auf 100 ccm eingengt. Die so erhaltene Essigesterlösung von *Z-Thr(tBu)-OH* wird nach Abkühlen auf 0° mit 1.84 g (10 mMol) *2,4-Dinitro-phenol* und

⁹⁾ E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. 97, 2490 (1964). DCHA = Dicyclohexylamin.

2.06 g (10 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und über Nacht bei 0° gerührt. Das i. Vak. eingedampfte Filtrat vom *Dicyclohexylharnstoff* ergibt ein gelbliches Öl, das beim Behandeln mit Wasser fest wird. Das abfiltrierte Material wird nach Trocknen bei 10⁻³ Torr über P₂O₅ aus Diäthyläther/Petroläther umkristallisiert: Schmp. 87–88°; $[\alpha]_D^{20}$: $-12.1 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -14.3° ($c = 1$; in Methanol). Ausb. 2.93 g (62%).

C₂₂H₂₅N₃O₉ (475.4) Ber. C 55.57 H 5.30 N 8.83 O 30.28
Gef. C 55.48 H 5.39 N 8.83 O 30.41

8. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [7-15a]

a) Das nach 6. erhaltene ölige *Z-Thr(tBu)-OSU* [7c] in 20 ccm Dimethylformamid wird bei 0° unter Rühren zu 5.8 g (4 mMol) *H-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [8-15c] und 0.56 ccm (4 mMol) *Triäthylamin* in 150 ccm Dimethylformamid gegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemp. wird die Reaktionsmischung i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird beim Behandeln mit 300 ccm verd. Citronensäure-Lösung unter Eiskühlung fest. Nach sorgfältigem Verreiben wird das Produkt abfiltriert, mit Wasser gewaschen, anschließend aus Methanol/Wasser umgefällt und letztlich i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Aus Methanol/Diäthyläther/Petroläther Schmp. 207–209°; $[\alpha]_D^{20}$: $-5.6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -7.2° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30), n-Butanol/Wasser/Eisessig (6 : 2 : 2), n-Butanol/Äthanol/Wasser (2 : 2 : 1) und n-Propanol/Essigester/Wasser (7 : 1 : 1). Ausb. 5.75 g (82%).

C₈₉H₁₄₀N₁₀O₂₃ (1718.2) Ber. C 62.17 H 8.15 N 8.15 O 21.42
Gef. C 61.80 H 8.30 N 8.11 O 21.41

b) 1.45 g (1 mMol) [8-15c] und 0.16 ccm *Triäthylamin* in 40 ccm Dimethylformamid werden bei Raumtemp. und unter Rühren 0.57 g (1.2 mMol) *Z-Thr(tBu)-ODNP* [7d] in 10 ccm Dimethylformamid zutropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, anschließend auf die Hälfte des Volumens i. Vak. eingengt, das nach Behandeln mit sehr verd. Citronensäure-Lösung ausgefallene feste Produkt abfiltriert, mit Wasser gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Die Lösung des rohen *Nonapeptid-Derivates* in Methanol wird zur Entfärbung mit Aktivkohle behandelt, anschließend mit Diäthyläther/Petroläther (1 : 1) versetzt, das ausgefällte Material abfiltriert und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet: Schmp. 208–209°; $[\alpha]_D^{20}$: $-5.5 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -6.8° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30) und n-Butanol/Äthanol/Wasser (2 : 2 : 1). Ausb. 1.2 g (70%).

9. *2-Nitro-phenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [7-15b]

a) 11.6 g (8 mMol) *H-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH* [8-15c] in 150 ccm Dimethylformamid werden mit 1.12 ccm *Triäthylamin* und 4.2 g (8.8 mMol) *NPS-Thr(tBu)-OSU* [7g]⁶ versetzt und die Reaktionsmischung bei Raumtemp. 15 Stdn. bis zum gallertartigen Erstarren gerührt. Beim Behandeln der Masse mit 1000 ccm verd. Citronensäure-Lösung (pH 4) flockt das Produkt aus; es wird nach sorgfältigem Verreiben abfiltriert und mit Wasser gut nachgewaschen. Das noch feuchte Produkt wird in wenig heißem Methanol aufgelöst; beim Stehenlassen der Lösung über Nacht bei 0° scheidet sich reines, kristallines *Nonapeptid-Derivat* ab. Es wird abfiltriert und i. Vak. bei 10⁻³ Torr getrocknet: $[\alpha]_D^{20}$: $-20.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -23.0° ($c = 0.9$; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30), Chloroform/Methanol

(7 : 3) bzw. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2) bzw. *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (2 : 2 : 1). Ausb. 12.4 g (89 %).

$C_{87}H_{137}N_{11}O_{23}S$ (1737.2) Ber. C 60.15 H 7.95 N 8.87 O 21.19 S 1.81
Gef. C 59.94 H 8.05 N 8.58 O 21.43 S 1.94

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu
Ber.	1	2	2	2	1	1
Gef.	0.95	1.81	2.06	1.85	1.02	1.03

b) 1.45 g (1 mMol) des *Octapeptides* [8-15c] in 20 ccm Dimethylformamid werden mit 0.14 ccm *Triäthylamin* und 0.54 g (1.2 mMol) *NPS-Thr(tBu)-ONP* [7h]⁶⁾, wie unter a) beschrieben, jedoch 30 Stdn. umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Umkristallisieren aus Methanol $[\alpha]_D^{20}$: $-20.6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -22.9° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Ausb. 1.3 g (75 %).

(Ähnlich gute Ergebnisse erhält man unter Verwendung der aktiven Ester *NPS-Thr(tBu)-ODNP* [7j] und *NPS-Thr(tBu)-OPCP* [7k]⁶⁾.)

10. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-serin-methylester* [8d]: 88.5 g *Z-Ser(tBu)-OH* [8c]⁵⁾ in 1000 ccm absol. Methanol werden bei 5° unter Rühren mit etwas mehr als der ber. Menge äther. *Diazomethan*-Lösung tropfenweise versetzt. Die zum Schluß aufgetretene schwache Gelbfärbung der Reaktionsmischung wird durch Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure zerstört. Der nach Einengen i. Vak. erhaltene Rückstand wird in warmem Petrolbenzin (60 bis 80°) aufgenommen; beim Stehenlassen in der Kühltruhe bei -10° tritt Kristallisation ein: Schmp. $43 - 43.5^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $+6.3 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+7.3^\circ$ ($c = 2.8$; in Äthanol). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/Pyridin/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 91.0 g (98 %).

$C_{16}H_{23}NO_5$ (309.4) Ber. C 62.12 H 7.49 N 4.53 Gef. C 62.13 H 7.28 N 4.53

11. *O-tert.-Butyl-L-serin-methylester-hydrochlorid* [8e-Hydrochlorid]: 89.0 g *Z-Ser(tBu)-OCH₃* [8d] in 1000 ccm Methanol werden wie üblich hydriert, wobei durch Zutropfen von 2*n* methanol. Salzsäure pH 4.5 eingehalten wird. Das Filtrat vom Katalysator dampft man i. Vak. ein; der erhaltene Rückstand wird aus Essigester/Diäthyläther oder aus Isopropylalkohol/Diäthyläther umkristallisiert. Schmp. $173.5 - 174.5^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $+8.82 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+10.17^\circ$ ($c = 1$; in Äthanol). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/Pyridin/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 59.2 g (97 %).

$C_8H_{18}NO_3Cl$ (211.7) Ber. C 45.39 H 8.57 Cl 16.75 N 6.62
Gef. C 45.51 H 8.55 Cl 17.03 N 6.68

12. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serin* [7-8d]: 61.8 g *Z-Thr(tBu)-OH* [7b] — in üblicher Weise durch Zerlegung des Dicyclohexylammoniumsalzes als kristalline Masse hergestellt —, 42.5 g *H-Ser(tBu)-OCH₃·HCl* [8e-HCl] und 27.8 ccm *Triäthylamin* in 600 ccm Dichlormethan werden bei -10° mit 45.4 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt; die Reaktionsmischung rührt man 3 Stdn. bei -10° und 6 Stdn. bei Raumtemp. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, die Lösung des erhaltenen Rückstandes in Diäthyläther wie üblich mit verd. Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und letztlich i. Vak. eingedampft: Öl (*Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-OCH₃* [7-8c]). Ausb. quantitativ.

Das erhaltene ölige [7-8c] in 250 ccm Dioxan/Wasser (4 : 1) wird mit 200 ccm *n* NaOH „titrimetrisch“ wie üblich verseift (Thymolphthalein als Indikator). Anschließend tropft man unter Kühlung und Rühren 200 ccm *n* H₂SO₄ zu, entfernt den größten Teil des Dioxans i. Vak. und extrahiert mit Essigester. Die abgetrennte organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft: Öl. Ausb. 78 g (98 %) nach Trocknen bei 10^{-4} Torr.

13. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-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 [7-23a]*

a) 6.64 g (16.3 mMol) *Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-OH [7-8d]* und 17.6 g (6.5 mMol) *H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [9-23c]*^{2b)} werden in 220 ccm Dimethylformamid warm gelöst, auf -10° abgekühlt und mit 1.12 g (9.7 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* und 1.68 g (8.15 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Man rührt zunächst 18 Std. bei 0° , dann weitere 12 Std. bei Raumtemp. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand mit Wasser behandelt, das gebildete feste Material abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet. Der rohe Acyl-peptidester wird zweimal mit je 150 ccm heißem Essigester/Äthanol (4 : 1) digeriert und anschließend dreimal aus 50proz. Äthanol umkristallisiert: Schmp. 230 bis 230.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-12.1 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -15.2° ($c = 1.3$; in 80proz. Essigsäure). Ausb. 13.45 g (70%).

Das so gewonnene Produkt enthält max. 1% an nicht umgesetztem Pentadecapeptidester. (Elektropherogramm des nach 3stdg. Behandeln mit Trifluoressigsäure „deblockierten“ Peptid-Derivats; SS 2034 A, Natriumacetatpuffer pH 4.9 (0.1 m), 110 V/1.5 mA, 6 Stdn.).

$C_{138}H_{223}N_{25}O_{35}Br_2$ (2952.3) Ber. C 56.14 H 7.61 Br 5.41 N 11.86
Gef. C 56.16 H 7.81 Br 5.41 N 11.91

b) Zu 1.72 g (1 mMol) *Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [7-15a]* und 1.51 g (1.15 mMol) *H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23b]*⁷⁾ in 40 ccm Dimethylformamid werden bei -15° 0.18 g (1.55 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* und 0.24 g (1.15 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Über Nacht erstarrt die Reaktionsmischung zu einer gallertigen Masse. Man bringt durch Zugabe von 150 ccm Dimethylformamid wieder in Lösung, rührt weitere 20 Stdn. bei Raumtemp. und dampft anschließend i. Vak. ein. Das erhaltene Produkt wird mit Essigester und Diäthyläther ausgekocht, auf das Filter gebracht und i. Vak. getrocknet. Nach erneutem Digerieren mit Wasser, Diäthyläther sowie heißem Essigester und Trocknen bei $50^{\circ}/10^{-3}$ Torr Schmp. 242° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-12.4 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -15.8° ($c = 1$; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30), n-Propanol/Essigester/Wasser (7 : 1 : 1) und n-Butanol/Äthanol/Wasser (2 : 2 : 1). Ausb. 2.1 g (71%).

$C_{138}H_{223}N_{25}O_{35}Br_2$ (2952.3) Ber. C 56.14 H 7.61 Br 5.41 N 11.86 O 18.79
Gef. C 56.17 H 7.64 Br 5.43 N 11.76 O 19.04

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe	Val	NH ₃
Ber.	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Gef.	0.96	2.70	2.99	1.72	0.99	1.0	2.02	1.0	0.99	0.99	1.02	1.42

14. *2-Nitro-phenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-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 [7-23b]*

8.7 g (5 mMol) *NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH [7-15b]* und 7.5 g (5.75 mMol) *H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-*

Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23h]⁷⁾ in 120 ccm Dimethylformamid werden bei -15° mit 1.15 g (10 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* und 1.18 g (5.75 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach 40stdg. Rühren bei 0° und 20 Stdn. bei Raumtemp. wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft, der feste Rückstand nach sorgfältigem Verreiben mit Wasser auf das Filter gebracht und i. Vak. sofort getrocknet. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Essigester/Diäthyläther und Trocknen bei $50^{\circ}/10^{-3}$ Torr Schmp. 238° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-4.9 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -6.3° ($c = 1$; in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30), Chloroform/Methanol (7 : 3) und n-Butanol/Äthanol/Wasser (2 : 2 : 1). Ausb. 12.75 g (85%).

$C_{136}H_{220}N_{26}O_{35}S$ Br₂ (2971.3) Ber. C 54.97 H 7.33 Br 5.37 N 12.26 O 18.85 S 1.05
Gef. C 55.03 H 7.43 Br 5.31 N 11.81 O 19.14 S 1.11

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe	Val	NH ₃
Ber.	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Gef.	1.01	2.79	3.09	1.73	1.04	0.99	1.98	1.00	1.02	1.00	0.98	1.51

15. *O-tert.-Butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ε-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* [7-23c]

12 g (4.07 mMol) *Benzyloxycarbonyl-peptidester* [7-23a] in 200 ccm Dimethylformamid und 200 ccm 80proz. Äthanol werden wie üblich 12 Stdn. bei 40° hydriert. Der nach Einengen der filtrierten Reaktionslösung i. Vak. erhaltene Rückstand wird mit Diäthyläther behandelt, auf das Filter gebracht und i. Vak. bei 50° getrocknet; Schmp. 223° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-16.2 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20.2° ($c = 0.8$; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30) und tert.-Butylalkohol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20). Ausb. 11.2 g (98%).

$C_{130}H_{217}N_{25}O_{33}$ Br₂ (2818.2) Ber. C 55.40 H 7.76 N 12.43 O 18.74
Gef. C 55.43 H 7.99 N 12.22 O 18.83

[333/67]