

derschlag wird abgenutzt und aus wenig Aceton umkristallisiert. Man erhält eine Verbindung vom Smp. 59°, die mit 3-Nitrodiphenyl (XVII) keine Smp.-Depression gibt.

8. *Identifikation von 3-Amino-2-acetylamino-diphenyl (XXVI)*. – a) *Verseifung zu 2,3-Diaminodiphenyl (XVI)*. Eine Probe 3-Amino-2-acetylamino-diphenyl (XXVI) wird mit konz. Salzsäure im Bombenrohr 10 Std. bei 100° gehalten und anschliessend eingedampft. Mit Acetylaceton und Eisen(II)-chlorid wird die für o-Diamine charakteristische Violetttrotfärbung erhalten.

b) *Abbauversuch von XXV zu XVIII*. Das durch Verseifung einer Probe von 3-Nitro-2-acetylamino-diphenyl (XXV) mit Salzsäure erhaltene Amin liess sich nicht diazotieren und mit  $H_3PO_2$  reduzieren.

#### SUMMARY

In agreement with predictions by the molecular orbital theory (LONGUET-HIGGINS) 2-amino-diphenylene reacts with benzenediazonium ions in 3-position.

Acetylation and hydrogenation of the diazo coupling product of 2-amino-diphenylene gives a mixture of 3,4- and 4,3-amino-acetylamino-diphenyl; these degradation products have been identified by syntheses.

Wissenschaftliche Abteilung des Farben-  
departementes (H.H.B.),  
CIBA AKTIENGESellschaft, Basel, und  
Technisch-chemisches Laboratorium (H.Z.),  
Eidg. Technische Hochschule, Zürich

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

#### III. Das Decapeptid H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH und einige seiner Derivate<sup>1)2)</sup>

von R. Schwyzer und H. Kappeler

(4. X. 61)

Für die Synthese eines corticotrop wirksamen Nonadcapeptides<sup>3)</sup> hatten wir das kristallisierte, sterisch einheitliche Decapeptid-Derivat BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (I) verwendet. Die *t*-Butoxycarbonylgruppe wurde als Schutzgruppe gewählt, weil sie sich aus dem Endprodukt unter sehr milden Bedingungen (Lösen in Trifluoressigsäure) wieder abspalten lässt<sup>4)</sup>. Glutamin wurde anstelle von Glutaminsäure Nr. 5 eingesetzt, weil so die  $\gamma$ -Carboxylgruppe als «Amid» geschützt ist; solche Amide sind biologisch oft ebenso wirksam wie die

<sup>1)</sup> In dieser Arbeit werden die Aminosäurereste im wesentlichen nach dem Vorschlage von E. BRAND & J. T. EDSALL, Ann. Review Biochemistry 16, 223 (1947), abgekürzt; gross geschriebene Symbole bedeuten die natürliche (L-)Form, klein geschriebene die unnatürliche (D-). BOC- = *t*-Butyloxycarbonyl = (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-; Z- = Carbobenzoxy = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCO-; Bu<sup>t</sup> = *t*-Butyl = -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid.

<sup>2)</sup> II. Mitteilung: Helv. 44, 159 (1961).

<sup>3)</sup> R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, Angew. Chem. 72, 915 (1960); die dort angegebene Aktivität konnte auf 28 I. E./mg präzisiert werden (Prof. Dr. F. SCHULER).

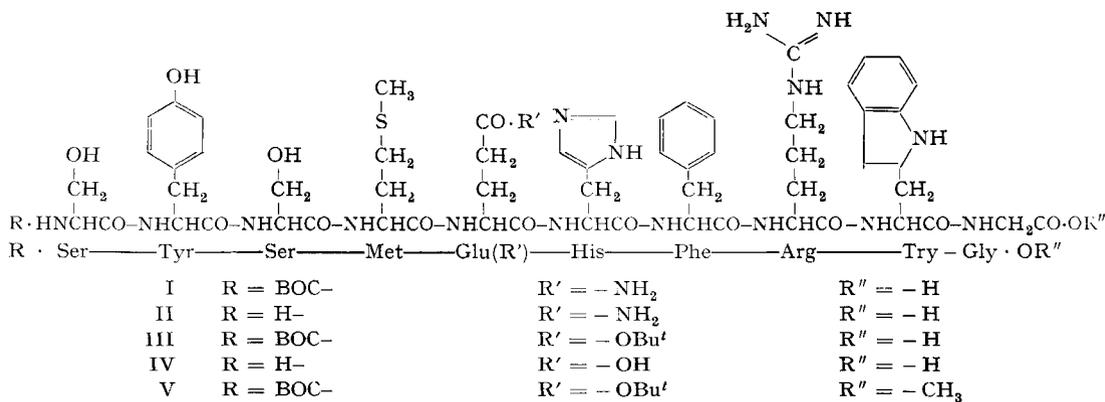
<sup>4)</sup> R. SCHWYZER & W. RITTEL, Helv. 44, 159 (1961).

Carbonsäuren<sup>5)</sup> und lassen sich sauer relativ mild hydrolysieren<sup>5) 6)</sup>. Die säurekatalysierte Spaltung von I führte zum Decapeptid- $\gamma$ -amid, H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (II)<sup>7)</sup>, welches *in vitro* aus Hypophysen Corticotropin freisetzte<sup>8)</sup>.

Um das Prinzip der äusserst mild spaltbaren Schutzgruppen für den Aufbau komplizierter und langer Polypeptidketten konsequent weiterzuführen, haben wir auch den Glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester in die Synthesen einbezogen<sup>9)</sup>. Carbobenzyloxyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester wurde auf verschiedenen Wegen hergestellt und zum Aufbau des kristallisierten, sterisch einheitlichen Dekapeptid-Derivates BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (III) verwendet. Auflösen von III in Trifluoressigsäure entfernte in wenigen Minuten beide Schutzgruppen, wobei chromatographisch und elektrophoretisch einheitliches und sterisch reines Decapeptid H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (IV) entstand. Das geschützte Derivat III diente zur Synthese des Tetracosapeptides  $\beta^{1-24}$  Corticotropin<sup>9)</sup>; das freie Peptid IV ist auch von HOFMANN und Mitarbeitern<sup>10)</sup> auf anderem Wege hergestellt worden und zeigte eine gewisse adipokinische Wirksamkeit<sup>11)</sup>.

Endlich wurde auch noch der Gly<sup>10</sup>-Methylester V von III hergestellt, welcher ebenfalls kristallisiert erhalten werden konnte.

Die ausgezeichnete Kristallisationsfähigkeit aller hier beschriebener Decapeptide (insbesondere derer mit L-Glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester) lassen die geschützten Verbindungen I, III und V als besonders günstige Zwischenprodukte für die Synthese noch höherer Peptide erscheinen. Zusätzlich zeichnen sie sich durch den Umstand aus, dass sie als C-endständigen Rest Glycin tragen, der für weitere Kondensationen



<sup>5)</sup> Vgl. z. B. W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Angew. Chem.* **69**, 179 (1957); R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287, 1273 (1958); R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 667 (1961).

<sup>6)</sup> Inzwischen haben K. HOFMANN & H. YAJIMA, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2289 (1961), das Prinzip der sauren Hydrolyse von Amidgruppen in der Seitenkette von längeren Peptiden zur selektiven Freilegung der Carboxylgruppe ebenfalls angewandt.

<sup>7)</sup> H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Experientia* **16**, 415 (1960).

<sup>8)</sup> M. PRIVAT DE GARILHE, C. GROS, J. PORATH & E.-B. LINDNER, *Experientia* **16**, 414 (1960).

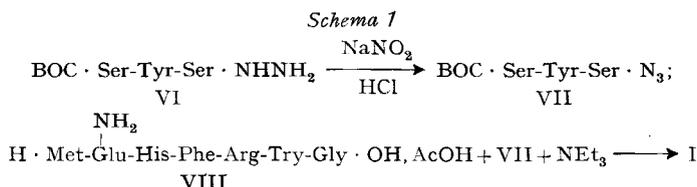
<sup>9)</sup> H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 1136 (1961).

<sup>10)</sup> K. HOFMANN & H. YAJIMA, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2289 (1961).

<sup>11)</sup> M. S. RABEN, R. LANDOLT, F. A. SMITH, K. HOFMANN & H. YAJIMA, *Nature* **189**, 681 (1961).

besonders günstig ist<sup>12)</sup>, da er *per se* sterisch wenig gehindert ist und natürlich nicht racemisiert werden kann.

*BOC · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly · OH (I)*: Zur Synthese von I wurde das kristallisierte, sterisch einheitliche Heptapeptidamid VIII<sup>13)</sup> mit dem Säureazid VII, welches aus dem entsprechenden Säurehydrazid VI<sup>14)</sup> hergestellt worden war, in Dimethylformamid kondensiert (Schema 1). Das rohe Reaktionsprodukt I (Ausbeute 90%) enthielt (nach Papierchromatogrammen in den Systemen 43, 45 und 54<sup>15)</sup>) nur ca. 5% eines einzigen Nebenproduktes. Kristallisation aus viel Methanol ergab eine papierchromatographisch reine, kristallisierte, hygroskopische Verbindung. Zur Analyse wurde sie im System *n*-Butanol : 0,1 M Ammoniumacetat (pH 7) der Gegenstromverteilung unterworfen (*K* = 4,7), wobei (nach Äquilibration mit Luftfeuchtigkeit) das Monoacetat-trihydrat erhalten wurde.



*H · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly · OH (II)*: Durch Auflösen von I in Trifluoressigsäure wurde das freie Decapeptidamid II als Trifluoracetat erhalten; Abbau mit Leucinaminopeptidase<sup>16)</sup> und papierchromatographischer Vergleich mit entsprechenden Mengen der erwarteten Aminosäuren [in einer Dimension Hochspannungselektrophorese (3000 Volt, pH 1,9) und in der zweiten Dimension Papierchromatographie im System 52<sup>15)</sup>] zeigte, dass alle Aminosäuren in ihrer natürlichen Form vorliegen.

*BOC · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu')-His-Phe-Arg-Try-Gly · OH (III)*: Der Aufbau dieser Verbindung (III) erfolgte nach Schema 2.

<sup>12)</sup> R. SCHWYZER, XVII. Internationaler Kongress für Reine und Angewandte Chemie, Bd. 2, 130 (1959).

<sup>13)</sup> H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* 43, 1453 (1960).

<sup>14)</sup> B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 169 (1961).

<sup>15)</sup> Papierchromatographie auf WHATMAN-Papier Nr. 1 und 3, Systeme

40: *n*-Butanol-Äthanol-Wasser = 2:2:1;

41: *t*-Butanol-*n*-Butanol-Wasser = 4:3:3;

42: *n*-Propanol-Essigester-Wasser = 7:1:2;

43: *t*-Pentanol-Isopropanol-Wasser = 100:40:55

45: *sek.*-Butanol-3-proz. Ammoniak = 100:44;

48: *n*-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser = 10:10:2:5;

49: *sek.*-Butanol-Triäthylamin-Diäthylbarbitursäure-Wasser-Isopropanol = 100:0,8:1,8 g:60:10;

50: *t*-Amylalkohol-Isopropanol-Triäthylamin-Veronal-Wasser = 100:40:0,8:1,8 g:50;

52: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser = 100:10:30;

54: *sek.*-Butanol-Isopropanol-Monochloressigsäure-Wasser = 70:10:3 g:40.

<sup>16)</sup> Das Enzym wurde nach den Angaben von R. L. HILL, D. H. SPACKMAN, D. M. BROWN & E. L. SMITH, *Biochemical Preparations*, Vol. 6, 35 (1958), J. Wiley & Sons, New York, N.Y., von Herrn Dr. W. RITTEL aus Schweinsnieren hergestellt. Die Vorschrift wurde bis und mit der Acetonfällung befolgt; die Lösung enthielt 1,2 mg Protein-N pro ml und eine spez. Aktivität von *C*<sub>1</sub> = 15.



wurde noch erhärtet durch die Abspaltung der Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure, die zum einheitlichen, kristallisierten, freien Decapeptid IV führte, das von Leucinaminopeptidase quantitativ zu den Aminosäuren<sup>16)</sup> aufgespalten wird.

*H·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XIV)*: Das Tetrapeptid-Derivat L-Phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester (XIV) wurde mittels HBr in Eisessig<sup>17)</sup> und Soda aus Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester (XX)<sup>18)</sup> erhalten. Dieser Syntheseweg ist kürzlich von HOFMANN & LANDE<sup>19)</sup> ebenfalls beschrieben worden. Diese Autoren haben XX auf demselben Wege aufgebaut wie KAPPELER<sup>18)</sup>; die Smp. stimmen überein, zum Vergleich der  $[\alpha]_D$ -Werte haben wir unsere Messungen (Methanol) im selben Lösungsmittel wie HOFMANN (Dimethylformamid) wiederholt und sehr gute Übereinstimmung gefunden, die sterische Einheitlichkeit wurde bereits in unserem Laboratorium bewiesen (vgl. auch <sup>9)</sup>, Fussnote 9)). Wir möchten aber darauf hinweisen, dass das Gemisch aus sterisch einheitlichem Z·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XX) und partiell racemisiertem Produkt, H·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (mit Nitro-D-arginin), welches sich in den Mutterlaugen anreichert, in Dimethylformamid nahezu die gleiche spezifische Drehung zeigt wie kristallisiertes, sterisch einheitliches XX. Die Messung in Methanol erlaubt dagegen eine klare Unterscheidung der partiell racemisierten von der alles-L-Form. So fanden wir für Z·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XX, L-L) in Methanol  $[\alpha]_D^{28} = -18,5 \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,336$ )<sup>18)</sup> und in Dimethylformamid  $[\alpha]_D^{28} = -18,5 \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ). Diese Verbindung war etliche Male umkristallisiert worden und erwies sich als sterisch einheitlich (enzymatischer Abbau). Ein nur einmal kristallisiertes Produkt (224/13), welches offenbar noch viel (ca. 10%) des diastereomeren Z·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (L-D-L) enthielt, zeigte in Methanol  $[\alpha]_D = -10,9^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1$ ), in Dimethylformamid aber immer noch  $[\alpha]_D = -18,6 \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1$ ). Man kann daraus entnehmen, dass weder der kristalline Zustand noch die Drehung in Dimethylformamid in diesem Falle eine Beimischung des Diastereomeren (L-D-L) erkennen lassen. Wir konnten die Versuche von HOFMANN und Mitarbeitern<sup>19)</sup> nicht bestätigen, wonach die Verwendung der Methode der gemischten Anhydride zur Verknüpfung von Z·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)·OH und H·Try-Gly·OCH<sub>3</sub> weniger Anlass zu partieller Racemisierung gibt als die Carbodiimid-Methode<sup>18)</sup> (Vergleich der Produkte mittels ihrer spezifischen Drehung in Methanol).

*BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OCH<sub>3</sub>, Monoacetat, Monohydrat (V)*: Die Synthese dieser Verbindung erfolgte, ausgehend von Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XV), nach Schema 3. Katalytische Reduktion entfernte Carbobenzoxy- und Nitro-Gruppen; XXI konnte als Diacetat aus 50-proz. Methanol kristallin erhalten werden. Seine Kondensation mit dem Tetrapeptidazid XIX in Dimethylformamid ergab in ca. 80% Ausbeute das aus 50-proz. Methanol mit je einer Mol. Essigsäure und Wasser kristallisierende Decapeptid-Derivat V.

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-t-butylester (IX)*: Dieses wichtige Zwischenprodukt wurde, ausgehend von Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-α-benzylester (XXII)

<sup>17)</sup> D. BEN-ISHAI & A. BERGER, J. org. Chemistry 17, 1564 (1952); D. BEN-ISHAI, *ibid.* 19, 62 (1954).

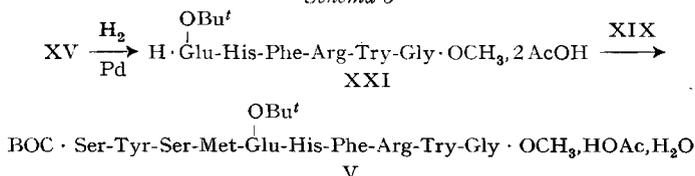
<sup>18)</sup> H. KAPPELER, Helv. 44, 476 (1961).

<sup>19)</sup> K. HOFMANN & S. LANDE, J. Amer. chem. Soc. 83, 2286 (1961).

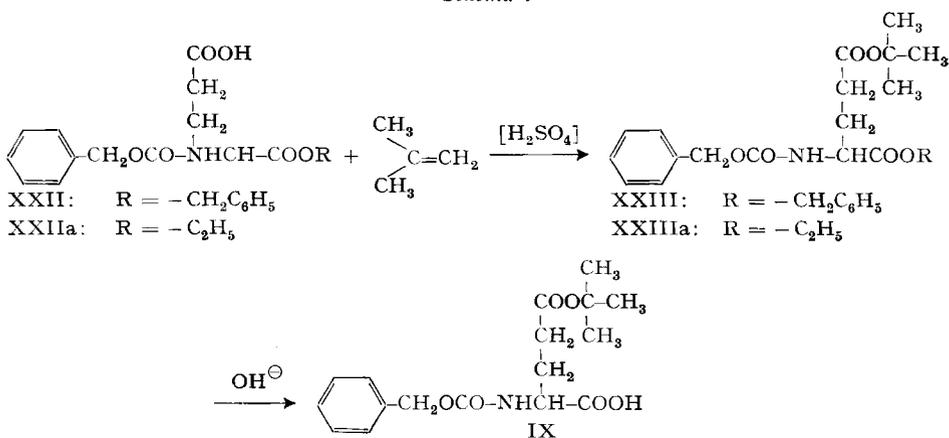
<sup>20)</sup> und von Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester (XXIIa)<sup>21)</sup>, auf den beiden im Schema 4 angegebenen Wegen hergestellt.

Einwirkung von Isobutylen ( $H_2SO_4$  als Katalysator)<sup>22)</sup> in Dioxan bzw. Methylenchlorid auf die Monoester XXII und XXIIa lieferte in guten Ausbeuten die  $\gamma$ -*t*-Butylester XXIII und XXIIIa, von denen der  $\alpha$ -Benzylester XXIII kristallisiert werden konnte (Smp. 46–48°); XXIIIa konnte bisher nur als Öl gefasst werden.

Schema 3



Schema 4



Selektive Verseifung von XXIII und XXIIIa lieferte in ausgezeichneter Ausbeute Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester (IX), der bisher ebenfalls nicht kristallisiert werden konnte, dessen gut kristallisiertes Dicyclohexylaminsalz sich zur Reinigung und Aufbewahrung jedoch sehr gut eignet. Es kann mit einem sauren Ionenaustauscher (Dowex 50 X-8) leicht wieder in die Komponenten gespalten werden.

Die Einführung der in der Peptidchemie an sich bekannten, mit Säuren leicht spaltbaren Schutzgruppen *t*-Butoxycarbonyl- (BOC-)<sup>23)</sup> und *t*-Butyl-(Bu<sup>t</sup>-, als Ester)<sup>22)</sup> in Amino- und Carboxylgruppen der Seitenketten von Aminosäuren (wie sie von uns systematisch bearbeitet wurde<sup>3) 4) 9)</sup>) ist nicht besonders einfach; die

<sup>20)</sup> H. SACHS & E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 75, 4610 (1953).

<sup>21)</sup> F. WEYGAND & K. HUNGER, Z. Naturforschung 13b, 50 (1958).

<sup>22)</sup> R. W. ROESKE, Chemistry and Ind. 1959, 1121; G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).

<sup>23)</sup> L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. 79, 4427 (1957); F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, *ibid.* 4686; G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.* 6180; R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, Helv. 42, 2622 (1959).

Mühe lohnt sich aber, da ihre Entfernung aus den Endprodukten sehr leicht geht, und die Ausbeuten gegenüber der Abspaltung gewöhnlich verwendeter Schutzgruppen, wie Tosyl-, Formyl-, Carbobenzyloxy-, Benzyl- usw., um ein Vielfaches besser sind. Wir glauben deshalb, dass die Synthese komplizierter Peptide nach Methoden, wie sie in dieser und in vorhergehenden Arbeiten<sup>3) 4) 5)</sup> beschrieben sind, bedeutende methodische Vorteile bietet.

*Stabilität der verwendeten Säureazide (VII, XIII, XIX):* Im Verlaufe dieser Arbeit wurde in einigen Fällen die Azidmethode zur Kondensation von Peptiden verwendet. Neben dem grossen Vorteil, dass die Methode nur sehr wenig Racemisierung (wenn überhaupt!) verursacht, ist sie aber mit dem Nachteil behaftet, dass das Säureazid je nach Konstitution, Lösungsmittel und Temperatur mehr oder weniger leicht einer CURTIUS'schen Umlagerung unterliegt. Diese führt zum Isocyanat, welches mit der Peptid-Komponente mit freier Aminogruppe zu unerwünschten Nebenprodukten reagiert. Wir untersuchen deshalb laufend unsere Azid-Ansätze im IR. Die Gruppe  $-\text{CO}\cdot\text{N}_3$  zeigt eine scharfe Bande bei  $4,75\ \mu$ ; tritt CURTIUS'sche Umlagerung ein, so verschwindet diese Bande und macht der Absorption der  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$  Gruppe bei  $4,5\ \mu$  Platz<sup>24)</sup>. Mit dieser Stabilitätskontrolle (vgl. exper. Teil) lässt sich die Sicherheit bei solchen Kondensationen stark erhöhen.

### Experimenteller Teil<sup>15)</sup>

*BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>COOH, 3H<sub>2</sub>O (I)<sup>7)</sup>:* 740 mg (1,5 mMol) BOC-Ser-Tyr-Ser. NHNH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O (VI)<sup>14)</sup> werden rasch in 5 ml auf  $-10^\circ$  vorgekühlter 1N HCl (mit 10% NaCl zur Gefrierpunktniedrigung) gelöst und tropfenweise mit 0,36 ml kalter 5N NaNO<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Das Säureazid scheidet sich dabei als dicker, käsiger Niederschlag aus. Die Lösung wird mit kaltem Essigester überschichtet und (nach 5 Min. bei  $-10^\circ$ ) damit extrahiert (2mal mit je 15 ml). Die Essigesterphasen werden vereinigt, 2mal mit 2 ml Wasser ( $0-5^\circ$ ) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird darauf im Vakuum bei Z.-T. auf 4–5 ml eingedampft und dann mit 6 ml Dimethylformamid ( $-10^\circ$ ) verdünnt.

Eine unter gelindem Erwärmen vorbereitete Lösung von 780 mg (0,75 mMol) H-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>COOH (VIII)<sup>18)</sup> in 12 ml Dimethylformamid wird bei Z.-T. mit 1,2 ml einer 10-proz. Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid (0,86 mMol) versetzt und auf  $-10^\circ$  gekühlt. Dazu wird die frische Azidlösung gegeben und das Ganze 2 Tage bei  $0^\circ$  aufbewahrt. Die Lösung wird dann auf  $-10^\circ$  gekühlt und mit 0,43 ml 2N HCl neutralisiert. Das rohe Reaktionsprodukt wird darauf mit viel Essigester ausgefällt, abgenutscht und über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i. V. getrocknet. Die erste Kristallisation aus Methanol ergibt ein stark hygroskopisches Kristallinat (70% d. Th.), Smp.  $202^\circ$  (u. Zers.). Zur Analyse wird eine Probe im System *n*-Butanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7) über 30 Stufen multiplikativ verteilt. Die Verbindung besitzt  $K = 4,7$ ; sie wird einmal aus Dimethylformamid mit Essigester umgefällt und 6 Std. bei  $60^\circ/10^{-2}$  Torr getrocknet (je nach den Bedingungen enthält das Präparat wechselnde Mengen Essigsäure). Das hygroskopische Präparat wird 1 Tag lang an der Luft stehengelassen.  $[\alpha]_D^{25} = -21,8^\circ \pm 1,7^\circ$  ( $c = 0,321$  in Eisessig). Rf: 54/0,75; 45/0,72; 43/0,73.

C<sub>64</sub>H<sub>87</sub>O<sub>17</sub>N<sub>17</sub>S, CH<sub>3</sub>COOH, 3H<sub>2</sub>O (1512,63) Ber. C 52,40 H 6,46 N 15,74 CH<sub>3</sub>COOH 1,04%  
Gef. „ 52,73 „ 6,19 „ 15,41 „ 1,20%

*H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>COOH (H<sub>2</sub>O?) (II)<sup>7)</sup>:* 125 mg BOC-Decapeptid (I) werden mit 1,5 ml wasserfreier Trifluoressigsäure 1 Std. bei Z.-T. stehengelassen. Die Trifluoressigsäure wird bei  $40^\circ$  abgedampft; der sirupöse Rückstand wird wiederholt mit viel absolutem Äther verrieben. Das Trifluoacetat des Decapeptides wird als leicht rosa gefärbtes Pulver erhalten. Die getrocknete Verbindung wird in 1 ml Wasser gelöst und mit weiteren 30 ml Wasser durch eine Ionenaustauschersäule IR-4B (Acetatform) gewaschen. Nach dem

<sup>24)</sup> Cf. E. LIEBER & E. OFTEDAHL, J. org. Chemistry 24, 1014 (1959).

Verdampfen des Wassers wird der glasige Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und mit Aceton gefällt: 100 mg H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH<sub>2</sub>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (H<sub>2</sub>O?) (II), Smp. 192–194°, als papierchromatographisch einheitliche Verbindung. Rf-Werte: 45/0,51; 50/0,47; 54/0,58 (Ninhydrin, PAULY, SAKAGUCHI).

2,0 mg dieser Verbindung wurden unter den gleichen Bedingungen wie für (XVII) beschrieben von Leucinaminopeptidase<sup>16</sup>) total abgebaut. Die Aminosäuren wurden auf einem Papierbogen durch Hochspannungselektrophorese bei pH 1,9 und 3000 V während 1 Std. (1. Dimension) und Papierchromatographie im System 52 (2. Dimension) getrennt; es liessen sich keine Peptide mehr nachweisen.

*Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester (XI)*: Die Lösung von 13,25 g (39 mMol) Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-t-butylester und 7,43 g (44 mMol) L-Histidin-methylester (Smp. 58–61°) in 120 ml Acetonitril wird nach Abkühlen auf 0° mit 9,24 g (44 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Der Ansatz wird 1 Std. bei 0° gerührt und noch 15 Std. bei 0° aufbewahrt. Dann wird der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit wenig Essigester gespült und aus dem Filtrat durch Zugabe von 500 ml Äther das Dipeptid als Gallerte ausgefällt. Es wird abfiltriert und mit Äther und Petroläther gewaschen. Durch Umfällen aus Essigester-Äther werden 15,2 g (80%) Reinprodukt als weisses, mikrokristallines Pulver erhalten, Smp. 116°, Rf: 49/0,96; 54/0,95. Nach Abspaltung der t-Butylestergruppe (5 Min. mit Trifluoressigsäure bei 20° stehen lassen) betragen die Rf-Werte 49/0,69; 54/0,78.

Das Analysenpräparat wird noch einmal aus Essigester/Äther umgefällt, Smp. 116–118°,  $[\alpha]_D^{20} = -11,4^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,250$ , Methanol).

C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub> (488,53) Ber. C 59,00 H 6,60 N 11,47% Gef. C 58,86 H 6,41 N 11,58%

*Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin (XII)*: 488 mg Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester (XI) werden in 1,5 ml Methanol gelöst und durch Stehenlassen mit 1,2 ml 1N NaOH während 8 Min. bei 20° verseift. Nach Zugabe von 1,2 ml 1N HCl wird im Vakuum auf die Hälfte eingedampft. Das Peptid wird mit 20 ml n-Butanol extrahiert; die Butanolphase wird mehrmals mit je ca. 3 ml Wasser gewaschen, bis die Chloridprobe mit AgNO<sub>3</sub>-HNO<sub>3</sub> negativ ist. Das Butanol wird bis auf kleine Reste abgedampft und das Peptid aus dem öligen Rückstand durch Zugabe von Essigester und Petroläther als gallertige Masse ausgefällt. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Petroläther und Trocknen wird das Rohprodukt aus Methanol-Essigester-Petroläther umgefällt: 402 mg Reinprodukt (85%), Smp. unscharf bei ca. 120°, bei der Papierchromatographie einheitlich, Rf: 49/0,84; 54/0,90. Nach Abspaltung der t-Butylestergruppe mit Trifluoressigsäure (5 Min. bei 20°) ist Rf: 49/0,44, 54/0,77.

*Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-hydrazid (XIII)*: Die auf 0° gekühlte Lösung von 4,88 g (10 mMol) Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-methylester (XI) in 40 ml abs. Äthanol wird mit 1,6 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 60 Std. bei dieser Temperatur wird auf ein kleines Volumen eingeeengt und viel Äther zugesetzt. Das Carbobenzoxy-dipeptidhydrazid fällt als schmieriges Produkt aus, das dann fest wird. Nach 10 Std. bei 0° wird der Niederschlag durch eine G-2-Glasfritte abfiltriert, mit viel Äther und Petroläther gewaschen und zum Schluss bei 40° im Hochvakuum getrocknet, 4,6 g (94%), Smp. 119–120°.

Das Hydrazid ist in kaltem Äthanol und Methanol gut, dagegen in Essigester auch in der Hitze nur schwer löslich. Wiederholt aus Methanol/Wasser umkristallisiert, schmilzt das Analysenpräparat bei 140–142° (Sintern 75°),  $[\alpha]_D^{20} = -40,5^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,91$  in 1N HCl).

C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>N<sub>6</sub> (488) Ber. C 56,54 H 6,60 N 17,20% Gef. C 56,31 H 6,69 N 17,16%

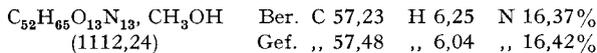
*H·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XIV)*: 10,5 g (13,8 mMol) Carbobenzoxy-tetrapeptidester werden unter leichtem Erwärmen in 24 ml Eisessig gelöst und die wieder auf Zimmertemperatur gekühlte Lösung mit 24 ml 4N HBr in Eisessig versetzt. Nach 60 Min. werden die Hauptmenge Eisessig und der Bromwasserstoffsäure-Überschuss im Vakuum abgedampft. Der sirupöse Rückstand wird mit viel abs. Äther verrieben. Das körnige, leicht rot gefärbte Dihydrobromid wird einmal aus wenig abs. Methanol mit viel Äther ausgefällt, im Vakuum getrocknet und anschliessend zwischen 5 ml 2N Sodalösung und 40 ml Chloroform-Butanol (1:1; v/v) verteilt. Die organischen Phasen werden mit Sodalösung bis zur phenolphthalein-alkalischen Reaktion behandelt, und die wässrig alkalischen Auszüge werden noch 2mal mit Chloroform-Butanol extrahiert. Die

mit Wasser neutral gewaschene und über Natriumsulfat getrocknete Chloroform-Butanol-Lösung wird im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft und der Tetrapeptidester mit viel Petroläther ausgefällt. 7,2 g (84%), Rf-Werte: 52/0,55 und 54/0,75. (1 Ninhhydrin- und EHRlich-positiver Fleck).

*Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XV)*. – a) *Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid*: 474 mg (1 mMol) Carbobenzoxy-( $\gamma$ -*t*-butyl)-L-glutamyl-L-histidin und 623 mg (1 mMol) L-Phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester werden unter Erwärmen in 2,5 ml abs. Dimethylformamid und 15 ml abs. Acetonitril gelöst. Nach Abkühlen auf 0° werden 248 mg (1,2 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid eingetragen, und das Ganze 6 Std. bei 0° und 18 Std. bei 22° gerührt. Zum Schluss wird durch Zugabe von viel trockenem Äther das Rohprodukt, zusammen mit ein wenig Dicyclohexyl-harnstoff, ausgefällt (1020 mg, Smp. ca. 140°). Das feste Produkt wird unter Erwärmen in 20 ml Methanol gelöst. Daraus wird das Hexapeptid-Derivat nach Abkühlen durch Zugabe von 120 ml trockenem Äther als flockiger Niederschlag ausgefällt. Nach 2- bis 3-maligem weiterem Umfällen in analoger Weise und Aufarbeitung der Mutterlaugen wurden insgesamt 880 mg (72%) eines leicht bräunlichen, amorphen Pulvers, Smp. ca. 155–165°, erhalten. Papierchromatographisch zeigt die Verbindung nach Abspaltung der *t*-Butylestergruppe mit Trifluoressigsäure (10 Min. bei 20°) Rf: 49/0,84; nach zusätzlicher Verseifung der Methylestergruppe mit 1N Natronlauge in Methanol-Wasser (5 Min. bei 22°) Rf: 49/0,62.

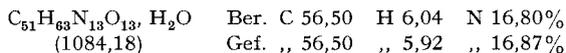
b) *Kondensation mittels Säureazid*: 4,8 g (10 mMol) *Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His·NHNH<sub>2</sub> (XIII)* werden in 40 ml eiskalter 1N HCl gelöst und mit 2,3 ml kalter 5N NaNO<sub>2</sub>-Lösung tropfenweise unter Rühren versetzt. Nach 4 Min. wird die Reaktionslösung mit eiskalter 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (40 ml) auf Phenolphthalein alkalisch gestellt, und das Azid mit zweimal 100 ml Essigester (0°) extrahiert. Die Essigesterauszüge werden mit Wasser neutral gewaschen, bei 0° mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und mit der eiskalten Lösung von 5,35 g (18,5 mMol) *H·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XIV)* versetzt. Während 16 Std. Stehen bei 0° scheidet sich das Hexapeptid-Derivat (XV) in reiner Form aus. Das gallertartige Produkt wird abgesaugt und mit Essigester und Äther gewaschen.

Die Mutterlauge wird bei 40° i. V. auf ein kleines Volumen eingeeengt; daraus wird mit Äther noch weiteres Hexapeptid-Derivat (XV) ausgefällt. Einmaliges Umfällen aus 95-proz. Methanol-Äther ergibt 6,3 g (68%) reines Material, Smp. 174–177°,  $\lambda_{max} = 272 \text{ m}\mu$  ( $\epsilon = 22300$ ). Zur Analyse wird ein Teil noch zweimal in gleicher Weise umgefällt, Smp. 176–178° (Sintern bei 170°).  $[\alpha]_D = -30,9^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,01$ , Methanol).



Papierchromatographisch verhielt sich die Verbindung wie diejenige, welche unter a) erhalten wurde.

*Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OH (XVI)*: 3,3 g (3,65 mMol) (XV) werden in 55 ml 75-proz. Dioxan mit 4,0 ml 1N NaOH während 15 Min. bei Z.-T. verseift. Die Reaktionslösung wird anschliessend in 350 ml Eiswasser, das 4,12 ml 1N HCl enthält, gegossen und 90 Min. bei 0° stehengelassen. Darauf wird das Carbobenzoxy-hexapeptid abfiltriert, 3 g, Smp. 204–205° (u. Zers.). Das Analysenpräparat wird aus viel Methanol kristallisiert, Smp. 210°,  $[\alpha]_D = -22,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,056$ , Dimethylformamid),  $\lambda_{max} = 272 \text{ m}\mu$  ( $\epsilon = 22900$ , 95-proz. Äthanol).



Die im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknete Substanz ist stark hygroskopisch.

Dünnschichtchromatogramm: Rf = 0,5 (Aceton-Dimethylformamid 1:1) und 0,8 (Dimethylformamid). Im Papierchromatogramm, in den Systemen 45,50 und 54, wandert die Substanz mit der Lösungsmittelfront.

*H·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>COOH (XVII)*: 2 g (1,85 mMol) *Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OH (XVI)* werden in 100 ml 90-proz. Essigsäure während 16 Std. bei Z.-T. mit 10-proz. Pd-Kohle als Katalysator hydriert. Nach Filtration vom Katalysator wird das Lösungsmittel bei 40° i. V. entfernt. Der Rückstand wird aus Methanol-Äther umgefällt, 1,66 g,  $\lambda_{max} = 290 \text{ m}\mu$  ( $\epsilon = 5200$ ); 282  $\text{m}\mu$  ( $\epsilon = 5900$ ) und Schulter bei 275  $\text{m}\mu$  ( $\epsilon = 5600$ ), Aufnahme in 95-proz. Methanol.

Je nach Trocknungsbedingungen im Hochvakuum über  $P_2O_5$  weist das Präparat verschiedene Acetatwerte auf:

$C_{43}H_{58}N_{12}O_9, CH_3COOH$	Ber. $CH_3COOH$ 1,59%
	Gef. „ 1,13; 1,07% ( 5 Std./60°)
	„ „ 0,49; 0,36% (10 Std./80°)

Im Papierchromatogramm (Rf: 45/0,70; 50/0,67; 54/0,67) und im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgur (Rf: 45/0,41; 50/0,20; 52/0,12) erwies sich die Verbindung als einheitlich (Ninhydrin-, PAULY-, EHRLICH- und SAKAGUCHI-Reagens). Bei der Hochspannungselektrophorese (auf Papier) wandert sie als einheitliche Zone (14,5 cm bei 3000 V und pH 1,9 in 60 Min.).

Leucinaminopeptidase<sup>16)</sup> spaltet die Verbindung (2 mg in 0,1 M Trispuffer pH = 8,5 + 0,002 M  $MgCl_2$ -Lösung<sup>25)</sup>) vollständig zu den Aminosäuren.

*H·Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, H<sub>2</sub>O (XVII a)*: 165 mg (0,16 mMol) *H·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (XVII)* werden in 2 ml Trifluoressigsäure gelöst und nach wenigen Min. bereits wieder vom Lösungsmittel befreit (i. V.). Der Rückstand (i. V. gut getrocknet) wird in 1 ml Wasser gelöst und durch eine kleine Säule von Amberlite IR-4 B (Acetat-Form) gewaschen. Die wässrigen Eluate (Ninhydrin-positiv) werden bei 40° i. V. verdampft, und der Rückstand aus wenig Wasser durch Zugabe von Äthanol kristallisiert: 107 mg, Smp. 230–233°. Im Papierchromatogramm ist die Verbindung einheitlich (Rf: 45/0,35; 50/0,25; 52/0,17; 54/0,04; Ninhydrin-, PAULY-, EHRLICH- und SAKAGUCHI-Reagens). Zur Analyse wurde das Präparat 10 Std. bei 60°/0,01 Torr. über  $P_2O_5$  getrocknet; es ist danach sehr hygroskopisch.

$C_{39}H_{50}N_{12}O_9, H_2O$  (848,94) Ber. C 55,18 H 6,17 N 19,80% Gef. C 55,46 N 5,82 N 19,36%

Die spezifische Drehung wurde bestimmt, nachdem das Präparat 24 Std. an der Luft gelegen hatte:  $[\alpha]_D = -15,1° \pm 1°$  ( $c = 0,1042$ , 1 N Essigsäure).

*BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>OH (III)*: 330 mg (0,55 mMol) *BOC·Ser-Tyr-Ser-Met·NHNH<sub>2</sub> (XVIII)* werden in 3,5 ml Dimethylformamid gelöst und auf  $-10°$  gekühlt. Nun werden 1,5 ml kalte 1 N HCl und dann 0,6 ml kalte 1 N  $NaNO_2$ -Lösung zugepft. Nach 3 Min. wird die Lösung mit 25 ml kaltem Wasser verdünnt und mit 4 ml 1 N  $NaHCO_3$ -Lösung auf pH 7–8 gestellt. Die Kristallisation wird durch Kratzen an der Gefässwand eingeleitet und ist nach ca. 15 Min. bei 0° beendet. Das Säureazid wird abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und bei 0° im Hochvakuum getrocknet (2 $\frac{1}{2}$  Std.)<sup>26)</sup>: 275 mg (85%), Smp. 98–102° (Zers.).

*I. R.-Spektrum des Säureazids*: 10 mg der getrockneten Verbindung werden in einem Gemisch von 0,2 ml Tetrahydrofuran und 1,8 ml Methylchlorid gelöst und im Infracord (PERKIN-ELMER) ausgemessen: Azid-Bande bei 4,75  $\mu$  stark ausgeprägt; die Isocyanat-Bande bei 4,5  $\mu$  fehlt. Wird die Messung der bei 0° aufbewahrten, kristallisierten Probe nach 1–2 Tagen wiederholt, so tritt die Isocyanat-Bande bei 4,5  $\mu$  stark in Erscheinung, währenddem die Azidbande abnimmt.

Die 275 mg (0,45 mMol) Säureazid werden nach dem Trocknen sofort unter Rühren in die auf  $-10°$  gekühlte Lösung von 400 mg (0,45 mMol) *H·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (XVII)* in 15 ml Dimethylformamid (+ 0,5 mMol Triäthylamin) eingetragen. Nach 20 Std. bei 0° wird die Lösung zuerst mit 0,2 ml Eisessig und dann mit viel Essigester versetzt: das rohe Decapeptid-Derivat wird dadurch in fester Form ausgefällt. Nach Abnutschen, Waschen mit Essigester und Trocknen: 580 mg (89%), Smp. 196–197° (u. Zers.). Kristallisation aus 30 ml 90-proz. Methanol ergibt 450 mg (70%) reines *BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, CH<sub>3</sub>OH*, Smp. 203° (u. Zers.),  $[\alpha]_D = -12,4° \pm 0,8°$  ( $c = 1,328$ , Dimethylformamid).

$C_{68}H_{94}O_{18}N_{16}S, CH_3OH$  Ber. C 55,71 H 6,64 N 15,07% Gef. C 55,88 H 6,59 N 14,82%

*H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (IV)*: 100 mg *BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (III)* werden, wie für *H·Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (XVII a)* beschrieben, mit Trifluoressigsäure behandelt und in die Acetat-Form übergeführt. Das freie Decapeptid wird aus wässrigem Methanol umkristallisiert, Smp. 210° (u. Zers.). Nach dem Trocknen im Hochvakuum über  $P_2O_5$  ist die Substanz sehr hygroskopisch. Die Hochspan-

<sup>25)</sup> B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 658 (1961).

<sup>26)</sup> Die Kristallisation des Säureazides gelingt oft besser, wenn an Stelle von 25 ml Wasser 25 ml gesättigte Natriumsulfat-Lösung verwendet wird.

nungselektrophorese auf Papier bei 3000 V und pH = 1,9 ergab nur ein Band (Ninhydrin-, PAULY- und SAKAGUCHI-Reagens), welches in 60 Min. 12,5 cm gewandert war.

Leucinaminopeptidase<sup>16)</sup> baute unter den üblichen Bedingungen<sup>26)</sup> das Präparat vollständig zu den Aminosäuren ab.

Die quantitative Aminosäurebestimmung<sup>27)</sup> (Totalhydrolyse mit HCl, Try wird zerstört) ergab die erwartete Zusammensetzung: Ser<sub>1,97</sub>, Tyr<sub>1,02</sub>, Met<sub>0,94</sub>, Glu<sub>1,05</sub>, His<sub>0,98</sub>, Phe<sub>1,03</sub>, Arg<sub>1,02</sub>, Gly<sub>1,05</sub>.

*H·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OCH<sub>3</sub>, 2CH<sub>3</sub>COOH (XXI)*: 1 g (0,93 mMol) Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XV) wird in 11 ml 90-proz. Essigsäure in Gegenwart von 250 mg 10-proz. Pd-Kohle während 5 Std. bei Z.-T. unter 5 Atü Druck hydriert, anschliessend wird nochmals mit 100 mg Katalysator versetzt und weitere 17 Std. bei Atmosphärendruck hydriert (CO<sub>2</sub> wird über KOH absorbiert). Die filtrierte Lösung wird bei 40° i. V. zur Trockne verdampft, der Rückstand wiederholt aus Methanol-Äther umgefällt und bei 40°/0,01 Torr getrocknet: 904 mg (95%), Smp. 119–121° (Sintern bei 115°). Die Verbindung ist papierchromatographisch einheitlich (Ninhydrin-, PAULY- und SAKAGUCHI-Reagens), Rf: 49/0,91; 54/0,73.  $\lambda_{max}$ : 290 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 5500), 281 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 6000), Aufnahme in 95-proz. Äthanol, danach ist Tryptophan vorhanden.

*BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O (V)*: 510 mg (0,85 mMol) BOC·Ser-Tyr-Ser-Met·NHNH<sub>2</sub> (XVIII) lieferten nach dem oben beschriebenen Verfahren 410 mg (82%) des entsprechenden Säureazids. Das Azid wird in die auf –10° gekühlte Lösung von 510 mg (0,5 mMol) H·Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OCH<sub>3</sub>, 2CH<sub>3</sub>COOH (XXI) und 0,139 ml (1 mMol) Triäthylamin in 10 ml Dimethylformamid eingetragen. Nach 15 Std. bei 0° wird das Lösungsmittel bei 40°/0,02 Torr zur Hauptsache verdampft, und das Reaktionsprodukt aus dem Rückstand mit Essigester ausgefällt. Abnutschen, Waschen mit Essigester und Äther, Trocknen 2 Std. bei 40°/0,01 Torr: 870 mg. 730 mg dieses Rohproduktes wurden aus 20 ml 50-proz. Methanol kristallisiert: 540 mg (ca. 80%) Decapeptid-Derivat (V). Smp. 202° (u. Zers.). Trocknen bei 40°/0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 4 Std. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = –26,6° ± 1° ( $c$  = 1,004, Dimethylformamid); die Verbindung ist nach dem Trocknen hygroskopisch.

C <sub>69</sub> H <sub>96</sub> O <sub>18</sub> N <sub>16</sub> S, CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O	Ber. C 55,10	H 6,64	N 14,48%
(1547,79)	Gef. „ 54,80	„ 6,44	„ 14,55%

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -t-butylester (XXIII)*<sup>20)</sup>: 8,3 g Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester werden in einer Druckflasche zusammen mit 25 ml abs. Dioxan auf –10° gekühlt; 95 ml verflüssigtes Isobutylen und 0,42 ml konz. Schwefelsäure werden zugegeben. Die zweiphasige Mischung wird verschlossen bei 20° während 20 Std. geschüttelt; sie wird nach ca. 2 Std. homogen. Zur Aufarbeitung wird mit 100 ml Wasser versetzt, das Isobutylen abgedampft und der Rückstand zweimal mit je 70 cm<sup>3</sup> Äther extrahiert. Aus den vereinigten Ätherportionen wird das noch unveränderte Ausgangsmaterial durch viermalige Extraktion mit je 50 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung bei 0° entfernt, und die organische Phase nach Neutralwaschen und Trocknen über MgSO<sub>4</sub> zur Trockne eingeeengt. Das farblose Öl kristallisiert nach einiger Zeit, Smp. 40–44°, 6,02 g (63%). Die Verbindung kann aus Essigester-Petroläther umkristallisiert werden, Smp. 46–48°; Trocknen 4 Std. bei 25°/10<sup>–2</sup> Torr. Ihre Identität ergab sich aus der Verseifung zu IX.

Aus der wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Phase werden nach Ansäuern und Extraktion mit Äther 3,2 g unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen.

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -äthyl- $\gamma$ -butylester (XXIIIa)*: Eine Lösung von 63 g (0,204 Mol) Z·Glu·OEt (XXIIa)<sup>21)</sup> in 425 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 2,14 ml reiner, konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird auf –80° gekühlt und mit 215 ml trockenem Isobutylen versetzt. Die homogene Lösung wird in einer Limonadeflasche 65 Std. bei Z.-T. aufbewahrt. Dann wird die Lösung wieder auf –80° gekühlt, mit 80 ml 2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt; das Isobutylen wird anschliessend bei 20°/15 Torr verdampft. Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase wird mit Wasser und 1N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, bis beim Ansäuern der Extrakte keine Trübung durch Ausgangsmaterial mehr entsteht. Die organische Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei 40°/15 Torr verdampft: 67,8 g (91%) öliges Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)·OEt. Die Verbindung konnte bisher nicht kristallisiert werden.

<sup>27)</sup> J. ROWE, D. H. SPACKMANN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185 (1958). Die Analyse wurde von Herrn Dr. ZUBER ausgeführt und ausgewertet.

*Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester (IX)*: 67,7 g (0,185 Mol) Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)·OEt werden in 450 ml 90-proz. Dioxan mit 204 ml 1N NaOH während 8 Min. bei Z.-T. verseift, dann versetzt man mit 204 ml 1N HCl und dampft bei 40°/15 Torr auf ein kleines Volumen ein. Der Rückstand wird in üblicher Weise mit Äther auf saure Produkte aufgearbeitet. Die Ätherlösungen werden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und auf total 500 ml eingedampft. Dann werden 41 ml Dicyclohexylamin zugegeben, worauf das Salz {Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)·O<sup>-</sup>+H<sub>3</sub>N(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>} zu kristallisieren beginnt. Nach 10 Std. wird es abgenutscht und getrocknet: 76,8 g (80%), Smp. 137–138°. Zur Analyse wird noch einmal aus H<sub>2</sub>O umkristallisiert, Smp. 140–141°, Trocknen bei 60°/0,01 Torr, 4 Std., [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +7,2° ± 0,7° (*c* = 1,452, Methanol).

C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (518,67) Ber. C 67,15 H 8,94 N 5,40% Gef. C 67,03 H 8,86 N 5,59%

Die rohe Verbindung, Smp. 137–138°, ist bereits papierchromatographisch einheitlich, Rf: 45/0,85 (das getrocknete Chromatogramm wurde mit einer 5-proz. Lösung von Acridin in EtOH besprüht und unter der UV.-Lampe ausgewertet).

Ein identisches Salz wird erhalten, wenn Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)·OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (XXIII) in analoger Weise verseift und verarbeitet wird. Die Ausbeuten sind ähnlich.

*Spaltung des Dicyclohexylaminsalzes von IX*: 76,2 g (0,146 Mol) des Dicyclohexylaminsalzes werden in 1,5 l 50-proz. Äthanol mit 130 ml Dowex 50-X8 (H<sup>+</sup>-Form) während 30 Min. bei Z.-T. gerührt. Die vom Ionenaustauscher abfiltrierte Lösung wird bei 40°/15 Torr eingeeengt und das abgeschiedene Öl mit Äther in der üblichen Weise extrahiert: 49 g (100%) Z·Glu(OBu<sup>t</sup>)·OH als Öl, welches bisher nicht kristallisiert werden konnte.

Herrn Dr. H. ZUBER verdanken wir die Ausführung der Hochspannungselektrophoresen und der Aminosäureanalysen. Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. W. PADOWERZ ausgeführt. Herr Dr. B. RINKER hat den Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzyl- $\gamma$ -*t*-butylester (XXII) hergestellt.

#### SUMMARY

The synthesis of the decapeptide H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH<sup>1)</sup> which constitutes an essential portion of the corticotropin (ACTH) and  $\alpha$ -melanotropin ( $\alpha$ -MSH) molecules, as well as 4 derivatives thereof (I, II, III, V) is described in detail. The derivative BOC·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)·His-Phe-Arg-Try-Gly·OH is, on account of its excellent crystallinity, the easy removability of the protecting groups by mild acid catalysis (BOC-, -OBu<sup>t</sup>), and the fact that the C-terminal amino-acid residue cannot racemize on condensation with other peptides, an especially useful intermediate for syntheses in the field of the hormones of the pituitary<sup>9) 12)</sup>. The introduction of the  $\gamma$ -*t*-butyl ester of glutamic acid is a new feature which proves especially valuable in connection with N-*t*-butoxycarbonyl-lysine<sup>3) 4) 8)</sup>. These protecting groups can be removed even from very complicated peptides by mild acid catalysis in excellent yield which is a definite improvement over current methods.

It is again pointed out with the example of Z·Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)·Try-Gly·OCH<sub>3</sub> (XX) that crystallinity and measurement of [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> in one solvent alone (*e. g.* dimethylformamide) cannot be taken to confirm optical purity. Specific rotations in methanol may, however, distinguish between the two isomers of (XX) with D- and L-Arg(NO<sub>2</sub>).

The azide method was used in several cases for condensation of peptides. We currently use IR.-spectroscopy to ensure the purity and stability of the azide. The -CO·N<sub>3</sub> group shows up at 4,75  $\mu$ ; CURTIUS rearrangement to the isocyanate -N=C=O results in a reduction of the amplitude of this band and the appearance of a peak at 4,5  $\mu$ <sup>24)</sup>.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung