

2.6-Diamino-2.6-dideoxy-D-galaktose-dihydrochlorid (VII). — 2.1 g VI werden in 15 ccm Acetanhydrid gelöst und mit 0.4 g PtO_2 5 Stdn. bei 3 at hydriert. Anschließend wird filtriert und i. Vak. abgedampft. Nach Aufnehmen in 40 ccm Methanol wird mit 0.4 g *Pd-Schwarz* und 0.7 ccm konz. Salzsäure 2 Stdn. bei 2 at hydriert, i. Vak. abgedampft und mit 10 ccm *Acetanhydrid*, 4 ccm *Triäthylamin* und 6 ccm *Pyridin* acetyliert. Nach 12 Stdn. wird in Eiswasser gegossen, mit $CHCl_3$ extrahiert, mit $NaHCO_3$ -Lösung und eiskalter 0.5*n* HCl gewaschen, abgedampft und in 2*n* HCl 1 Stde. bei 60°, dann 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Eindampfen i. Vak. und Aufnehmen in Wasser wird mit Kohle geklärt, das Filtrat eingedampft und VII aus Methanol/Isopropylalkohol kristallisiert. $[\alpha]_D^{20} = +102^\circ$ (5 Min.) $\rightarrow 95^\circ$ (24 Stdn.) ($c = 2$, Wasser). Das *IR-Spektrum* zeigt die typischen Hydroxyl- und Aminhydrochlorid-Banden und ist fast völlig identisch mit den Spektren der Dihydrochloride der 2.6-Diamino-2.6-dideoxy-D-glucose und -D-gulose. Im für Pyranosekonfigurationen charakteristischen Bereich von 730–960 cm^{-1} ergeben sich typische Bandenverschiebungen.

Über Peptidsynthesen, XXVIII*

3. Mitteilung über Glukagon-Teilsequenzen**

SYNTHESE DER N-TERMINALEN GLUKAGON-TEILSEQUENZ 1–11

VON EBERHARD SCHRÖDER

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

Eingegangen am 18. Juli 1964

Die N-terminale Undecapeptidsequenz des Glukagons wurde als freies Peptid (H-His-Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH₂)-Tyr-Ser-OH) und in substituierter Form als BOC-His-(*O*-*t*Bu)Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH₂)- [bzw. -Asp(β -*t*Bu-Ester)]-Tyr-Ser-NHNH₂ synthetisiert.

Für die Synthese der N-terminalen Aminosäuresequenz 1–11 des Glukagons wurden als Untereinheiten das früher beschriebene¹⁾ tert.-Butyloxycarbonyl-L-nistidyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyll-glycyl-L-threonyl-L-phenylalaninhydrazid (I) und die *Pentapeptidderivate* L-Threonyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester-hydrochlorid (II) bzw. *O*-tert.-Butyl-L-threonyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-

*¹⁾ XXVII. Mitteilung: E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **680**, 142 (1964).

²⁾ 2. Mitteilung: E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **670, 127 (1963); 1. Mitt.: E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, ebenda **656**, 190 (1962).

¹⁾ E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **670**, 127 (1963).

L-asparaginyll-L-tyrosyll-L-serinmethylester (III) bzw. L-Threonyll-L-seryll-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyll-L-serinmethylester (IV) verwendet (Glukagon enthält in Position 9 einen Asparagylrest).

Das Pentapeptidderivat II wurde aus tert.-Butyloxycarbonyll-L-threonyll-L-serinhydrazid (Azid-Bildung mit tert.-Butylnitrit²⁾) und L-Asparaginyll-L-tyrosyll-L-serinmethylester-hydrochlorid³⁾ (V) durch anschließende Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe vom entstandenen kristallinen tert.-Butyloxycarbonyll-pentapeptidester mit Trifluoressigsäure/HCl synthetisiert (Schema 1). Für das Pentapeptidderivat III wurde ein schrittweiser Aufbau gewählt und V zunächst mit *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-serinhydrazid¹⁾ bzw. *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-serin¹⁾ nach der Anhydrid-Methode⁴⁾ zum kristallinen *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-seryll-L-asparaginyll-L-tyrosyll-L-serinmethylester kondensiert (82 bzw. 53% Ausbeute). Nach katalytischer Hydrierung in Dimethylformamid mit Pd-Mohr wurde mit *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-threoninhydrazid¹⁾ zum kristallinen *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-threonyll-*O*-tert.-butyll-L-seryll-L-asparaginyll-L-tyrosyll-L-serinmethylester (76% Ausbeute) umgesetzt. Das voll geschützte Pentapeptid konnte auch aus *N*-Carbobenzoxy-*O*-tert.-butyll-L-threonyll-*O*-tert.-butyll-L-serinhydrazid und V erhalten werden. Katalytische Decarbobenzoylierung lieferte schließlich das elektrophoretisch einheitliche III.

Zur Synthese des einen Asparagylrest enthaltenden Pentapeptidderivates IV wurde aus Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester^{5,6,7)} und L-Tyrosyll-L-serinmethylester-hydrochlorid^{3,8,9)} nach der Anhydrid-Methode⁴⁾ (Chlorameisensäureisobutylester) mit 70-proz. Ausbeute der kristalline Carbobenzoxy-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyll-L-serinmethylester hergestellt. Katalytische Hydrierung und Umsetzung mit Carbobenzoxy-L-threonyll-L-serinhydrazid lieferte mit 52-proz. Ausbeute das voll geschützte Pentapeptid, aus dem durch katalytische Hydrierung der elektrophoretisch einheitliche Pentapeptidester IV entstand.

Die Umsetzung des tert.-Butyloxycarbonyll-hexapeptidhydrazids I mit den Pentapeptidestern II, III und IV führte zu den folgenden Undecapeptidderivaten: BOC-His-(*O*-tBu)Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH₂)-Tyr-Ser-OCH₃ (VI; 66% Ausbeute, amorph, scharfer Schmp.), BOC-His-(*O*-tBu)Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-

2) J. HONZL und J. RUDINGER, Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2333 (1961) [C. A. **55**, 27108 (1961)].

3) E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **656**, 190 (1962).

4) R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951).

5) R. SCHWYZER und H. DIETRICH, Helv. chim. Acta **44**, 2003 (1961).

6) E. WÜNSCH und A. ZWICK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **328**, 235 (1962).

7) E. SCHRÖDER und E. KLIEGER, Liebigs Ann. Chem. **673**, 208 (1964).

8) ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **41**, 1852 (1958).

9) L. T. SKEGGS JR., K. E. LENTZ, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, J. exp. Medicine **108**, 283 (1958) [C. A. **52**, 20305 (1958)].

(*O*-*t*Bu) Thr-(*O*-*t*Bu)Ser-Asp(NH₂)-Tyr-Ser-OCH₃ (VII; 40% Ausbeute, amorph, scharfer Schmp.) und BOC-His-(*O*-*t*Bu)Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(tert. Butylester)-Tyr-Ser-OCH₃ (VIII; 54% Ausbeute, kristallin, scharfer Schmp.). Durch Behandlung mit Hydrazinhydrat konnten die Undecapetidderivate VI, VII und VIII in die entsprechenden Hydrazide (IX, X und XI) umgewandelt werden. Diese Derivate sind für weitere Kupplungsreaktionen geeignet.

Das einen Asparaginyrest enthaltende Undecapeptidderivat VI konnte alkalisch verseift und durch Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe mit Trifluoressigsäure in das *freie Undecapeptid XII* übergeführt werden. Nach präparativer elektrophoretischer Reinigung¹⁰⁾ (Pheroplan, bei pH 2) wurde die Verbindung als Hemiacetat · 5H₂O isoliert. Neben der Elementaranalyse und der elektrophoretischen Einheitlichkeit wurde das *freie Undecapeptid* zum Strukturnachweis einem enzymatischen Abbau unterworfen. Mit *Leucinaminopeptidase* findet eine quantitative Hydrolyse in die einzelnen Aminosäuren statt. Durch *Chymotrypsin* wird das Undecapeptid hinter dem Phe⁶-Rest und dem Tyr¹⁰-Rest in H-His-Ser-Glu(NH₂)-Gly-Thr-Phe-OH, H-Thr-Ser-Asp(NH₂)-Tyr-OH und Serin gespalten. Der für die Synthese des Undecapeptids verwendete Pentapeptidester II war ebenfalls mit *Leucinaminopeptidase* quantitativ hydrolysierbar.

Für die Durchführung der präparativen Arbeiten bin ich Frl. D. THIELICKE und Herrn M. LEHMANN, für die enzymatischen Abbaueversuche Herrn G. KLOSS zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die *Schmelzpunkte* wurden auf dem Apparat nach TOTTOLI (Fa. W. BÜCHI, Flawil/Schweiz) bestimmt und sind nicht korrigiert. — Die *Drehwerte* wurden im lichtelektrischen Präzisionspolarimeter 0.005 der Fa. ZEISS (1959) gemessen (Fehlergrenze ± 0.5 bis 1°). — Zur *Analyse* wurden die Substanzen 5–16 Stdn. bei 40–100° und 10^{-1} – 10^{-2} Torr getrocknet. Die Mikroanalysen wurden in unserem analytischen Laboratorium (Dipl.-Ing. J. HUBER) ausgeführt. — Zur Reinheitskontrolle wurden sämtliche Verbindungen mittels *Dünnschichtchromatographie* (Methanol/Chloroform = 1 : 1, Benzol/Aceton = 1 : 2, *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 75 : 13 : 12) und *papierelektrophoretisch* (Essigsäure/Ameisensäure pH 2, Pyridiniumacetatpuffer pH 5 und Boratpuffer pH 9, jeweils mit Zusatz von Propylenglykol als Lösungsvermittler) untersucht. Zur *Papierchromatographie* wurden als Lösungsmittel *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5) verwendet. Die Anfärbungen erfolgten mit Ninhydrin-Cd¹¹⁾ und nach der Chlor-Methode¹²⁾.

tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-serinmethylester. — 2.33 g (10 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threoninhydrazid*³⁾ in 22.5 ccm 1 *n* HCl werden bei -5° mit 0.84 g NaNO₂ in 3 ccm Wasser und 5 Min. danach mit 2 g NaCl versetzt. Das Azid wird mit Essigester ex-

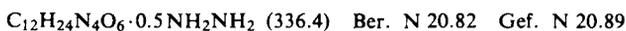
¹⁰⁾ J. BARROLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturforsch. **13b**, 754 (1958).

¹¹⁾ J. BARROLIER, Naturwissenschaften **42**, 416 (1955).

¹²⁾ H. ZAHN und E. REXROTH, Z. analyt. Chem. **148**, 181 (1955/56).

trahiert. Die mit gesätt. NaCl-Lösung neutral gewaschene und über Na_2SO_4 getrocknete Essigesterlösung wird mit 11 mMol *L-Serinmethylester* (aus 1.7 g Hydrochlorid⁸⁾ und 1.52 ccm Triäthylamin) in 6 ccm Dimethylformamid vereinigt und je 24 Stdn. bei 0° und bei 20° stehengelassen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester gelöst und mit wenig Citronensäure-Lösung, gesätt. NaCl-Lösung und NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Ausbeute 3.2 g (100%) wasserlösliches Öl.

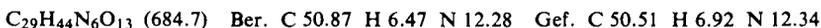
tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-serinhydrazid. — 2.4 g *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-serinmethylester* in 4 ccm Methanol werden mit 2.5 ccm $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Äther kristallisieren 1.75 g (70%) vom Schmp. 143.5–144.5° aus. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -19.7^\circ$ ($c = 1$, Methanol).



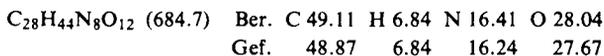
Zur Entfernung des überschüssigen Hydrazins werden 250 mg *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-serinhydrazid-0.5 Hydrazin* in 7 ccm Methanol + 2 ccm Wasser gelöst und 5 Min. mit 0.6 g *Dowex 50* (H^\oplus -Form) gerührt. Nach Einengen und Kristallisation aus Methanol/Äther erhält man 200 mg vom Schmp. 144–144.5°. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -21.2^\circ$ ($c = 0.5$, Methanol).



tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 672 mg (2 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-serinhydrazid-0.5 Hydrazin* in 2.9 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) werden 5 Min. bei –20° mit 0.37 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾ gerührt und anschließend mit 50 ccm Essigester versetzt. Die mit wenig gesätt. $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ -Lösung neutral gewaschene Essigesterlösung wird mit 2.2 mMol *L-Asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester* (aus 0.95 g Hydrochlorid³⁾ + 0.304 ccm Triäthylamin) in 5 ccm Dimethylformamid vereinigt, 48 Stdn. bei 0° aufbewahrt und eingeengt. Der Rückstand wird mit Essigester/Petroläther verrieben, aus Alkohol/Äther umgefällt, in 20 ccm Wasser gelöst und 10 Min. mit 1 g *Dowex 50* (H^\oplus -Form) gerührt. Aus der zur Hälfte eingeengten Lösung kristallisieren bei 0° 800 mg (58%) vom Schmp. 200–201°. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -16.3^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).



tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinhydrazid. — 2.04 g des voranstehenden *Methylesters* werden in 50 ccm Methanol mit 1.05 ccm $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und aus Dimethylformamid/Methanol umkristallisiert. Ausbeute 1.88 g (92%); Schmp. 211.5 bis 212°. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -11.0^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).



L-Threonyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester-hydrochlorid (II). — In eine Lösung von 2.38 g *tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester* in 20 ccm *Trifluoressigsäure* wird 1½ Stdn. unter Eiskühlung HCl-Gas eingeleitet. Anschließend wird i. Vak. eingeengt und aus Dimethylformamid/Essigester umgefällt.

Ausbeute 1.9 g (88 %) vom Schmp. 210–210.5°. $[\alpha]_D^{23} = -33.8^\circ$ ($c = 0.5$, 1 *n* HCl), -26.8° ($c = 0.5$, Wasser).

$C_{24}H_{36}N_6O_{11} \cdot HCl$ (621.0) Ber. C 46.42 H 6.01 Cl 5.71 O 28.34
Gef. 46.26 6.36 5.44 28.46

Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — a) *Azid-Methode*: Zu 0.309 g (1 mMol) *Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-serinhydrazid*¹⁾ in 1 ccm Tetrahydrofuran fügt man 1 ccm HCl-haltiges Tetrahydrofuran (2.2*n*) und versetzt bei -20° mit 0.122 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾. Nach ca. 5 Min. wird mit 20 ccm Essigester verdünnt, mit gesätt. $NaHCO_3$ - und 10-proz. NaCl-Lösung bis zur Neutralisation ausgeschüttelt und mit 1.05 mMol *L-Asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester* (aus 0.451 g Hydrochlorid³⁾ + 0.145 ccm Triäthylamin) 48 Stdn. bei 0° stehengelassen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 0.526 g (75 %) Nadeln vom Schmp. 224.5–225°. $[\alpha]_D^{25} = -18.9^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{32}H_{43}N_5O_{11}$ (673.7) Ber. C 57.05 H 6.43 N 10.40 Gef. C 57.45 H 6.69 N 10.35

b) *Anhydrid-Methode*: 0.150 g (0.5 mMol) *Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-serin*¹⁾ in 3 ccm Tetrahydrofuran werden bei -10° mit 0.069 ccm Triäthylamin + 0.048 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach 10–15 Min. bei -10° wird mit 0.55 mMol *L-Asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester* (aus 238 mg Hydrochlorid³⁾ mit 0.075 ccm Triäthylamin freigesetzt) in 2 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und mehrstündigem Stehenlassen wird mit Wasser versetzt. Man erhält 0.170 g (51 %) vom Schmp. 220–220.5°. $[\alpha]_D^{25} = -19.8^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

O-tert.-Butyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 3.85 g der voranstehenden Verbindung werden in Dimethylformamid wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Aus Alkohol erhält man 2.6 g (85 %) vom Schmp. 179–181.5°. $[\alpha]_D^{25} = -39.1^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{24}H_{37}N_5O_9$ (539.6) Ber. C 53.42 H 6.91 N 12.98 Gef. C 53.15 H 7.22 N 12.65

Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyll-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 1.85 g (5.75 mMol) *Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threoninhydrazid*¹⁾ + 3.0 g (5.5 mMol) *O-tert.-Butyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester* werden analog dem voranstehenden Tetrapeptid gekuppelt. Der Essigester wird i. Vak. abdestilliert, und nach Zugabe von Wasser kristallisieren 3.65 g (79 %) vom Schmp. 183.5–185° aus. Zur Analyse wird aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert. Schmp. 190–192°. $[\alpha]_D^{25} = -21.3^\circ$ ($c = 0.5$, Methanol).

$C_{40}H_{58}N_6O_{13}$ (830.9) Ber. C 57.82 H 7.03 N 10.12 Gef. C 57.29 H 7.18 N 9.92

Die Verbindung wurde auch auf dem Syntheseweg 2 + 3 hergestellt.

O-tert.-Butyl-L-threonyll-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-tyrosyl-L-serinmethylester (III). — 3.3 g des voranstehenden *Cbo-Esters* in 40 ccm Dimethylformamid werden mit *Pd-Mohr* hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Essigester verrieben und aus Alkohol/Petroläther umgefällt. Ausbeute 2.5 g (90 %). Schmp. 174.5–176°. $[\alpha]_D^{25} = -33.7^\circ$ ($c = 0.5$, Methanol).

$C_{32}H_{52}N_6O_{11}$ (696.8) Ber. C 55.16 H 7.52 N 12.06 Gef. C 54.81 H 8.03 N 12.12

Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester. — 1.62 g (5 mMol) *Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threoninhydrazid*¹⁾ werden bei -20° mit 5 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) + 0.61 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾ 5 Min. gerührt, mit 50 ccm kaltem Essigester versetzt und mit gesätt. NaHCO_3 -Lösung und 10-proz. NaCl-Lösung neutral gewaschen. Die über Na_2SO_4 getrocknete Lösung des Azids wird mit 5.5 mMol *O-tert.-Butyl-L-serinmethylester* (aus 1.15 g Hydrochlorid¹⁾ + 0.76 ccm Triäthylamin) in 3 ccm Dimethylformamid 2 Tage bei 0° aufbewahrt, eingeeengt und wie üblich gereinigt. Ausbeute 2.3 g (100%), Öl.

Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinhydrazid. — 2.3 g des voranstehenden *Methylesters* werden 3 Tage bei Raumtemperatur mit 10 ccm Methanol + 1 ccm $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ stehengelassen und dann eingeeengt. Aus Hexan kristallisieren 2.2 g (94%) Nadeln vom Schmp. $97-99^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = +29.4^\circ$ ($c = 0.5$, Methanol).

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$ (466.6) Ber. C 59.21 H 8.21 N 12.01 Gef. C 59.48 H 8.17 N 12.09

Carbobenzoxy-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 0.97 g (3 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester*^{5,6,7)} in 10 ccm Tetrahydrofuran werden bei -10° mit 0.415 ccm Triäthylamin + 0.405 ccm *Chlorameisensäureisobutylester* in das gemischte Anhydrid übergeführt, 15 Min. bei -10° gehalten und mit 3.3 mMol *L-Tyrosyl-L-serinmethylester* (aus 1.05 g Hydrochlorid^{3,8,9)} + 0.455 ccm Triäthylamin) gekuppelt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und mehrstündigem Stehenlassen wird eingeeengt und wie üblich gereinigt. Nach Kristallisation aus Alkohol/Wasser erhält man 1.24 g (70%) vom Schmp. $90-92^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -24.7^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (587.6) Ber. C 59.27 H 6.35 N 7.15 Gef. C 59.16 H 6.59 N 7.00

L-Asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 11.75 g *Carbobenzoxy-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester* werden in Methanol wie üblich hydriert, eingeeengt und aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 8.8 g, Schmp. uncharf. $[\alpha]_D^{25} = +5.2^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$ (453.5) Ber. C 55.62 H 8.84 Gef. C 55.05 H 7.29

Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 0.7 g (1.5 mMol) *Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinhydrazid* in 3 ccm Tetrahydrofuran werden bei -20° mit 1.5 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) und 0.18 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾ 5 Min. stehengelassen. Nach Zugabe von 20 ccm kaltem Essigester wird mit gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser extrahiert und mit 0.744 g (1.65 mMol) *L-Asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester* in 10 ccm Essigester vereinigt. Nach 48stdg. Stehenlassen bei 0° wird wie üblich gereinigt und 2mal aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 0.7 g (52%), Schmp. $105-109^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -4.0^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$\text{C}_{44}\text{H}_{65}\text{N}_{15}\text{O}_{14}$ (888.0) Ber. C 59.51 H 7.37 N 7.89 O 25.22
Gef. 58.72 7.46 8.19 24.88

O-tert.-Butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester. — 0.8 g der voranstehenden Verbindung werden in 15 ccm Methanol mit 0.2 g

Pd-Mohr hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt. Aus Alkohol/Petroläther erhält man 0.4 g vom Schmp. 182–184°. $[\alpha]_D^{25} = -37.6^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{36}H_{59}N_5O_{12}$ (753.9) Ber. C 57.35 H 7.89 N 9.29 O 25.46
Gef. 57.21 7.83 9.57 25.25

Carbobenzoxy-L-threonyl-L-seryl-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester. Zu 3.15 g (9 mMol) *Carbobenzoxy-L-threonyl-L-serinhydrasid*³⁾ in 30 ccm Dimethylformamid fügt man 9 ccm HCl-haltiges Tetrahydrofuran (2.2*n*) und versetzt bei –20° 5 Min. mit 1.1 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾. Die mit Triäthylamin neutralisierte Lösung des Azids wird 48 Stdn. bei 0° mit 4.5 g (10 mMol) *L-Asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester* in 20 ccm Essigester + 2 ccm Dimethylformamid stengelassen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand mit Wasser verrieben und aus Alkohol/Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 5.0 g (70%), Schmp. 117–120°. $[\alpha]_D^{25} = -20.9^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{36}H_{49}N_5O_{14}$ (775.8) Ber. C 55.73 H 6.36 N 9.03 Gef. C 55.34 H 6.64 N 9.00

L-Threonyl-L-seryl-L-asparagyl- β -tert.-butylester-L-tyrosyl-L-serinmethylester (IV). – 3.4 g der voranstehenden Verbindung werden in 50 ccm Methanol mit 1 g *Pd-Mohr* hydriert. Nach Filtration wird eingengt und der Rückstand aus Alkohol/Äther umgefällt. Ausbeute 3.2 g (99%) vom Schmp. 115–116°. $[\alpha]_D^{25} = -34.8^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{28}H_{43}N_5O_{12} \cdot 0.5H_2O$ (650.7) Ber. C 51.69 H 6.81 N 10.77 H₂O 1.38
Gef. 51.72 6.79 10.24 0.89

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinmethylester (VI). – Zu 2.12 g (2.5 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalaninhydrasid*¹⁾ in 7 ccm Dimethylformamid werden bei –15° 3.5 ccm HCl-haltiges Tetrahydrofuran (2.2*n*) und 0.31 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾ gefügt. Das hierbei ausfallende Azid wird durch Verdünnen mit 20 ccm Dimethylformamid in Lösung gebracht. Nach ca. 10 Min. wird mit Triäthylamin neutralisiert, vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt, mit *L-Threonyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinmethylester* (aus 2.5 mMol Hydrochlorid mit Triäthylamin) in 5 ccm Dimethylformamid vereinigt und je 24 Stdn. bei 0° und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der ausgefallene, gallertige Niederschlag wird abgesaugt und ergibt nach Erwärmen in Wasser, Absaugen und Trocknen 0.9 g (26%) vom Schmp. 218–220°. $[\alpha]_D^{25} = -15.0^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid). Durch Aufarbeiten der Mutterlauge (Einengen und Behandeln mit warmem Wasser) werden weitere 1.4 g (40%) erhalten. Schmp. 215–217°. $[\alpha]_D^{25} = -15.6^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{62}H_{91}N_{15}O_{22}$ (1398.5) Ber. C 53.24 H 6.56 O 25.17 Gef. C 52.85 H 7.02 O 25.27

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinhydrasid (IX). – 2.1 g des voranstehenden *Methylesters* in 30 ccm Dimethylformamid werden mit 0.7 ccm $N_2H_4 \cdot H_2O$ 7 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Durch Zusatz von Äther werden 2.1 g (100%) weißes Pulver ausgefällt. Schmp. 218–219°. $[\alpha]_D^{25} = -11.0^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{61}H_{91}N_{17}O_{21}$ (1398.5) Ber. C 52.39 H 6.46 N 17.03 O 24.02
Gef. 51.34 7.18 16.56 23.79

Aminosäureanalyse (72 Stdn., Hydrolyse 105°): His_{0.97}; Ser_{2.68}; Glu_{3.91}; Gly_{1.01}; Thr_{1.91}; Phe_{1.00}; Asp_{1.00}; Tyr_{0.86}; NH₃ 2.04.

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serin. — 700 mg des weiter oben beschriebenen *tert.-Butyloxycarbonyl-undecapeptidmethylesters* in 10 ccm Dioxan und 10 ccm Wasser werden 90 Min. mit 2 ccm 1*n* NaOH gerührt. Nach Abdestillieren des Dioxans wird mit Citronensäure angesäuert. Da nur eine kleine Menge Niederschlag ausfiel, wurde weiter eingengt, anschließend mit Äthanol/Äther verrieben, abgesaugt und gründlich mit kaltem Wasser ausgewaschen. Ausbeute 560 mg (79%), Schmp. 190–192°. Nach Umfällen aus Dimethylformamid Schmp. 201–203°. $[\alpha]_D^{25} = -12.0^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

C₆₁H₈₉N₁₅O₂₂ · 2H₂O (1420.4) Ber. C 51.58 H 6.60 N 14.80
Gef. 50.86 6.88 15.12

L-Histidyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serin · 0.5 CH₃COOH · 5 H₂O (XII). — 420 mg der voranstehenden Verbindung werden 1 Stde. mit 2 ccm *Trifluoressigsäure* geschüttelt. Auf Zusatz von Äther fällt ein weißer Niederschlag aus, der abgesaugt und mit viel Äther gewaschen wird: 0.4 g (99%) Ausbeute. 250 mg dieses Produktes, das im Elektropherogramm bei pH 2 eine kleine Nebenbande zeigte, wurden durch präparative Elektrophorese (Pheroplan)¹⁰ bei pH 2 gereinigt. Dabei wurden 107 mg einheitliches Produkt erhalten. $[\alpha]_D^{25} = -44.8^\circ$ ($c = 0.5$, Wasser).

C₅₂H₇₃N₁₅O₂₀ · 0.5 CH₃COOH · 5 H₂O (1348.3)
Ber. C 47.21 H 6.36 N 15.58 COCH₃ 1.59 H₂O 6.69
Gef. 47.15 6.38 15.37 1.34 6.65

Aminosäureanalyse (48 Stdn., Hydrolyse 105°): His_{0.89}; Ser_{2.66}; Glu_{0.97}; Gly_{1.03}; Thr_{1.92}; Phe_{1.00}; Asp_{1.03}; Tyr_{0.79}; NH₃ 2.00.

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinmethylester (VII). — Zu 0.423 g (0.5 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalaninhydrazid*¹⁾ in 1.5 ccm Dimethylformamid werden bei –10° 0.75 ccm HCl-haltiges Tetrahydrofuran (2.2*n*) und 0.06 ccm *tert.-Butylnitrit*²⁾ getropft. Da das entstehende Azid auszufallen begann, wurde sogleich mit 3 ccm und nach der üblichen Reaktionszeit von 10 Min. mit weiteren 5 ccm Dimethylformamid verdünnt. Nach Neutralisieren mit Triäthylamin und Abtrennen des Triäthylamin-hydrochlorids wird das Filtrat mit 0.349 g (0.5 mMol) *O-tert.-Butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinmethylester* in 2 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach 60 Stdn. bei 0° wird die ausgefallene Gallerte abgesaugt, mit warmem Wasser verrieben und mit Äthanol gewaschen. Ausbeute 0.3 g (40%). Schmp. 227–228°. $[\alpha]_D^{25} = -8.2^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

C₇₀H₁₀₇N₁₅O₂₂ (1510.7) Ber. C 55.65 H 7.14 N 13.91 O 23.30
Gef. 55.58 7.60 13.56 23.17

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparaginy-L-tyrosyl-L-serinhydrazid (X). — 75 mg (0.05 mMol) des voranstehenden *Methylesters* in 2 ccm Dimethylformamid

werden mit 0.025 ccm (0.5 mMol) $N_2H_4 \cdot H_2O$ 6 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Der ausgefallene amorphe Niederschlag wird abgesaugt und mit Äther verrieben. Ausbeute 65 mg (87%). Schmp. 225–227°.

$C_{69}H_{107}N_{17}O_{21}$ (1510.7) Ber. C 54.85 H 7.14 N 15.76 O 22.24
Gef. 53.93 7.68 15.97 22.01

tert.-Butyloxycarbonyl-*L*-histidyl-*O*-*tert.*-butyl-*L*-seryl-*L*-glutaminyglycyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl- β -*tert.*-butylester-*L*-tyrosyl-*L*-serinmethylester. — 1.41 g (1.65 mMol) *tert.*-Butyloxycarbonyl-*L*-histidyl-*O*-*tert.*-butyl-*L*-seryl-*L*-glutaminyglycyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalaninhydrazid¹⁾ in 5 ccm Dimethylformamid und 2.5 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) werden bei -15° mit 0.2 ccm *tert.*-Butylnitrit²⁾ versetzt. Nach 10 Min. bei -15° wird mit 15 ccm Dimethylformamid verdünnt, mit Triäthylamin neutralisiert, vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt und mit 1.08 g (1.65 mMol) *L*-Threonyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl- β -*tert.*-butylester-*L*-tyrosyl-*L*-serinmethylester in 3 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach je 24stdg. Stehenlassen bei 0° und bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingeeengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 1.35 g (54%). Schmp. 198–199°. $[\alpha]_D^{25} = -14.6^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{66}H_{98}N_{14}O_{23} \cdot 3H_2O$ (1509.6) Ber. C 52.51 H 6.94 N 12.99 H_2O 3.58
Gef. 52.24 6.84 12.57 3.35

tert.-Butyloxycarbonyl-*L*-histidyl-*O*-*tert.*-butyl-*L*-seryl-*L*-glutaminyglycyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl- β -*tert.*-butylester-*L*-tyrosyl-*L*-serinhydrazid (XI). — 435 mg des voranstehenden Methylesters in 4.5 ccm Dimethylformamid werden mit 0.15 ccm $N_2H_4 \cdot H_2O$ 6 Stdn. bei Raumtemperatur stengelassen. Das auf Zusatz von Äther ausgefällte Produkt wird abgesaugt und ergibt nach Waschen mit Äther und Trocknen 430 mg (99%) vom Schmp. 196–198°. Aus Methanol/Wasser (1:1) umkristallisiert: Schmp. 201–202°. $[\alpha]_D^{25} = -14.8^\circ$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{65}H_{98}N_{16}O_{22} \cdot 2H_2O$ (1491.6) Ber. C 52.34 H 6.89 N 15.03 H_2O 2.42
Gef. 51.68 6.30 15.84 2.29