

181. Über aktivierte Ester V. Verwendung der Cyanmethylester-Methode zur Herstellung von (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin auf verschiedenen Wegen

von B. Iselin, M. Feurer und R. Schwyzer.

(27. VIII. 55.)

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Abklärung der Frage, ob sich aktivierte Ester¹⁾ auch zur Synthese komplizierterer Peptidverbindungen eignen. Dazu wurde die Herstellung des Tripeptidderivates (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin (XII) nach der Cyanmethylester-Methode auf drei verschiedenen Wegen ausgeführt. Inzwischen ist diese Verbindung, deren Aminosäure-Sequenz auch im Ocytocin vorkommt²⁾, von C. W. Roberts auf andere Weise aufgebaut und beschrieben worden³⁾.

Während dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich unter Verwendung von Cyanmethylestern auch sterisch relativ stark gehinderte Peptidverbindungen mit guten Ausbeuten gewinnen lassen, wenn die Umsetzungen in konzentrierter Lösung vorgenommen und mit 1/20–1/10 Mol Eisessig katalysiert⁴⁾ werden.

Die optische Reinheit aller Produkte wurde tunlichst kontrolliert, da gewisse Methoden der Peptidsynthese unter dem Nachteil der Racemisierung leiden, wodurch ihre Anwendungsmöglichkeit eingeschränkt wird⁵⁾. Besonders der Racemisierungsgefahr ausgesetzt sind alle Synthesen, welche von einem an der freien Carboxylgruppe aktivierten Peptid-Derivat ausgehen, indem sehr oft die carboxylendständige, „aktivierte“ Aminosäure während der Reaktion teilweise oder ganz racemisiert wird. Deshalb wurde den Umsetzungen des (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-cyanmethylesters (VII) besondere Aufmerksamkeit geschenkt, und es wurde festgestellt, dass die Reaktion mit L-Isoleucin-äthylester zu einem Tripeptid-Derivat VIII führt, welches identisch ist mit den auf andern Wegen, nämlich durch Aufbau aus N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-

¹⁾ IV. Mitteilung: R. Schwyzer & B. Iselin in „Biochemistry of Nitrogen“ (Festschrift *Virtanen*), S. 181, Helsinki 1955, Suomalainen Tiedeakatemia; III. Mitteilung: R. Schwyzer, M. Feurer & B. Iselin, Helv. **38**, 83 (1955).

²⁾ Vgl. V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. C. Katsoyannis & S. Gordon, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3115 (1954).

³⁾ C. W. Roberts, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6203 (1954).

⁴⁾ R. Schwyzer, M. Feurer & B. Iselin, Helv. **38**, 83 (1955).

⁵⁾ M. Bergmann & L. Zervas, Biochem. Z. **203**, 280 (1928); V. du Vigneaud & C. E. Meyer, J. biol. Chemistry **99**, 143 (1932); W. M. Cahill & I. F. Burton, ibid. **132**, 161 (1940); J. R. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. **74**, 6137 (1952); B. F. Erlanger, H. Sachs & E. Brand, ibid. **76**, 1806 (1954).

cystein-cyanmethylester (I) und L-Tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (IX) bzw. (O-Tetrahydropyranyl-L-tyrosyl)-L-isoleucin-äthylester (X) gewonnenen Produkten. Nach diesem Beispiel zu urteilen, scheint also die Cyanmethylester-Methode der speziellen Gefahr der Racemisierung nicht unterworfen zu sein und deshalb eine wertvolle Ergänzung zu anderen Methoden der Peptidsynthese zu bieten.

Als Ausgangsmaterial für unsere Synthesen (s. Formel-Schema) benötigten wir N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester (I). Diese Verbindung wurde aus N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein (Ia)¹⁾ durch Umsatz mit Triäthylamin und Chloracetonitril bei Zimmertemperatur erhalten. Sie kristallisierte aus Äther-Petroläther in farblosen Kristallen, Smp. 67–68°, $[\alpha]_D^{19} = -23^\circ \pm 1^\circ$ (c = 4,23 in CHCl₃) und $-45^\circ \pm 1^\circ$ (c = 4,18 in CH₃COOH). Wurde die Umsetzung der Säure Ia zum aktivierte Ester bei höherer Temperatur vorgenommen, so trat teilweise bis vollständige Racemisierung ein. N-Carbobenzoxy-S-benzyl-DL-cystein-cyanmethylester kristallisierte aus Methylenchlorid-Petroläther, Smp. 100–101°. Dieses Beispiel ist der erste von uns bisher beobachtete Fall der Racemisierung bei der Herstellung eines aktivierte Esters. Beim Umkristallisieren und bei weiteren Umsetzungen verhält sich die optisch aktive Verbindung I vollkommen stabil, so dass angenommen werden kann, dass die Racemisierung sich während des Umsatzes mit Triäthylamin und Chloracetonitril abspielt, wobei, nach zahlreichen Versuchen zu schliessen, die Temperatur als entscheidender Faktor angesehen werden muss. Zur Prüfung der sterischen Einheitlichkeit des optisch aktiven Cyanmethylesters (I) wurde er mit Lauge in 99-proz. Ausbeute zur Säure Ia verseift, identisch mit dem Ausgangsmaterial (Smp., spezifische Drehung).

N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester (I) wurde mit L-Tyrosin-äthylester (II)²⁾ (in Tetrahydrofuran mit Eisessig als Katalysator) zum (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-äthylester (IV) umgesetzt (Roh-Ausbeute ca. 90%). Dieses Produkt wurde direkt zu (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin (VI) verseift, woraus der (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-cyanmethylester (VII), Smp. 114–115°, in 78-proz. Ausbeute hergestellt wurde. Die optische Reinheit der Verbindungen IV, VI und VII wurde durch Überführung in L-Cysteinyl-L-tyrosin (VIa) geprüft; die Eigenschaften von VIa stimmten mit den in der Literatur ange-

¹⁾ Erhalten nach den Vorschriften von C. R. Harrington & T. H. Mead, Biochem. J. **30**, 1598 (1936), und St. Goldschmidt & Ch. Jutz, Chem. Ber. **86**, 1116 (1953). Kristallisation aus Methylenchlorid-Petroläther erhöhte den Smp. auf 95–97°, $[\alpha]_D^{22} = -7^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,83 in CHCl₃), $-42^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,971 in Aceton), $-43^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,85 in C₂H₅OH), $-47^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,939 in Eisessig) und $-52^\circ \pm 1^\circ$ (c = 3,971 in Dimethylformamid). Die optische Reinheit wurde durch Überführung in L-Cystin, $[\alpha]_D^{21} = -213^\circ \pm 4^\circ$ (c = 1,01 in n. HCl), bestätigt.

²⁾ E. Fischer, Ber. deutsch. chem. Ges. **34**, 433 (1901).

gebenen¹⁾ überein. Die alkalische Verseifung des Dipeptid-cyanmethylesters VII zur optisch aktiven Säure VI durfte schon als Hinweis darauf angesehen werden, dass auch Aminolyse unter Erhaltung der Asymmetriezentren verlaufen würden.

Da der (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-äthylester (IV) unangenehme Eigenschaften besitzt, versuchten wir ein besser kristallisiertes Derivat zu gewinnen. Durch Kondensation des Cyanmethylesters I mit O-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester (III)²⁾ entstand der gut kristallisierte (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester (V), Smp. 164–166°, $[\alpha]_D^{23} = +26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,40$ in CHCl_3) (Harrington & Pitt hatten Smp. 149° gefunden²⁾). Die optische Reinheit wurde durch die nachfolgende Verseifung zu VI bestätigt.

Der Dipeptid-cyanmethylester VII reagierte glatt mit Benzylamin in Essigester zum Benzylamid VIIa. Langsamer verlief die Reaktion mit L-Isoleucin-äthylester³⁾; nach 4 Tagen konnte aber immerhin der reine, kristallisierte (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (VIII)⁴⁾ in einer Ausbeute von 74% erhalten werden.

Um die sterische Einheitlichkeit des Tripeptid-Derivates (VIII) nachzuprüfen, wurde es noch auf zwei anderen Wegen synthetisiert. N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester (I) wurde mit L-Tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (IX)⁵⁾ kondensiert; das entstandene Produkt VIII erwies sich als identisch mit dem auf die erste Art erhaltenen. Ebenfalls identisch erwies sich der Ester VIII, der durch Kondensation von I mit (O-Tetrahydropyran-yl-L-tyrosyl)-L-isoleucin-äthylester (X)⁶⁾ und nachfolgender Abspaltung des Tetrahydropyran-yl-Restes aus dem entstandenen N-(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-tetrahydropyran-yl-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (XI) hergestellt wurde. Da bei diesen Reaktionen eine Racemisierung unwahrscheinlich ist, dürfen wir annehmen, dass das Tripeptid-Derivat VIII mit der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{21} = -18^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4$ in Eisessig) das reine L-L-L-Diastereomere darstellt (Smp. 142–144°).

¹⁾ C. R. Harrington & R. V. Pitt, Biochem. J. **38**, 417 (1944). — C. W. Roberts & V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **204**, 871 (1953).

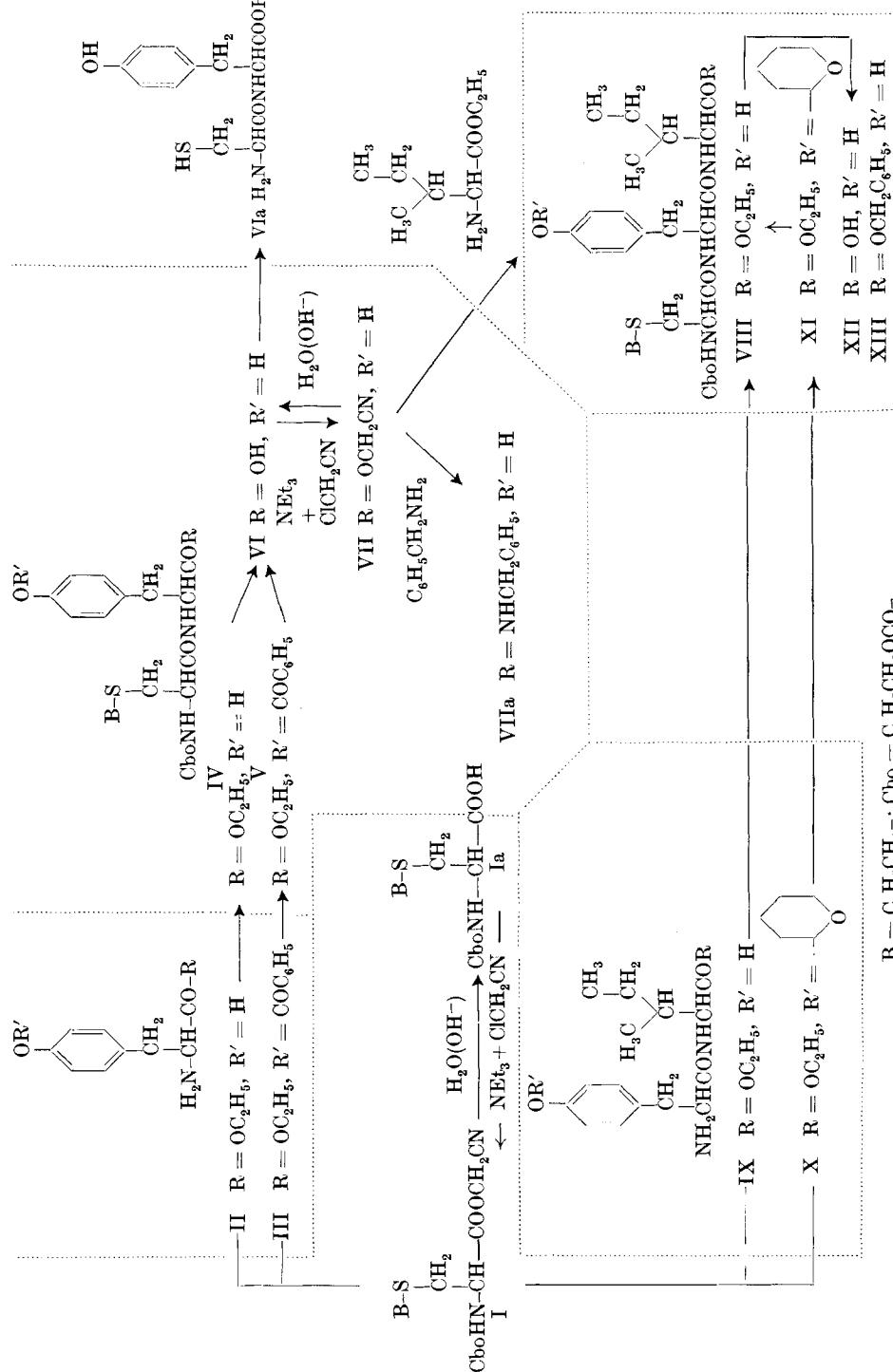
²⁾ Biochem. J. **38**, 417 (1944).

³⁾ E. L. Smith, D. H. Spackmann & W. J. Polgrose, J. biol. Chemistry **199**, 801 (1952), weisen auf die starke sterische Hinderung der Ammonolyse der Methylester des Valins und des Isoleucins hin. Die am β -Kohlenstoffatom verzweigte Kette schirmt nach unseren Erfahrungen auch die Aminogruppe stark ab.

⁴⁾ Die Verbindung ist bereits von C. W. Roberts (J. Amer. chem. Soc. **76**, 6203 (1954)) aus (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-azid hergestellt worden.

⁵⁾ Diese Verbindung wurde durch Kondensation von N,O-Dicarbobenzoxy-L-tyrosin-cyanmethylester mit L-Isoleucin-äthylester zum (N,O-Dicarbobenzoxy-L-tyrosyl)-L-isoleucin-äthylester und nachfolgende Hydrogenolyse gewonnen (vgl. exp. Teil).

⁶⁾ Herstellung vgl. folgende, VI. Mitteilung über aktivierte Ester.



Verbindung VIII konnte *Roberts*¹⁾ nur mit unbefriedigendem Ergebnis zu (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin (XII) verseifen (in Dioxan-Natronlauge). Deshalb stellte er die Verbindung über den entsprechenden Benzylester XIII durch Hydrogenolyse und nachfolgende Wiedereinführung der Carbobenzoxy- und S-Benzyl-Reste her. Es gelang uns, unter Verwendung von Methanol-n.NaOH, die Verseifung mit besserem Erfolg auszuführen (Ausbeute 53%). Bei der Reinigung der Säure XII kam uns die Beobachtung sehr zugute, dass sie in stärkerer Sodalösung unlöslich ist, mit 0,1-n. Soda aber aus ihrer Lösung in Essigester extrahiert werden kann, wodurch sie von störenden Begleitstoffen befreit wird. Der Smp. 164–166° entsprach dem von *Roberts* angegebenen (161–163°); $[\alpha]_D^{23}$ unserer Verbindung betrug $-11^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,84$ in Eisessig).

Experimenteller Teil²⁾.

N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester (I): 51,75 g (0,15 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein wurden unter Röhren bei 0° innert 15 Min. portionenweise zu einer Mischung von 22,72 g (0,225 Mol) Triäthylamin und 22,65 g (0,30 Mol) Chloracetonitril zugegeben. Durch weiteres Röhren bei 0° entstand nach 30 Min. ein klares, zähes Reaktionsgemisch, aus dem sich beim Stehen bei Zimmertemperatur allmählich Triäthylamin-hydrochlorid ausschied. Nach 15 Std. wurde mit Essigester verdünnt, vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und das Filtrat mit verd. Salzsäure, verd. Soda-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Aus dem Rückstand kristallisierten nach Zugabe von Äther und Petroläther 47,0 g (82%) des Cyanmethylesters I vom Smp. 65–67°. Nach einer Kristallisation aus Äther-Petroläther war die Verbindung analysenrein, Smp. 67–68°; $[\alpha]_D^{23} = -23^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,23$ in CHCl_3), $-45^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,18$ in Eisessig). Die spezifische Drehung blieb auch bei längerem Aufbewahren des Esters unverändert.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$	Ber. C 62,48	H 5,24	N 7,29%
	Gef. „ 62,73	„ 5,26	„ 7,31%

Aus dem Soda-Auszug wurden durch Ansäuern 5,2 g (11%) unverändertes Ausgangsmaterial regeneriert.

Zur Prüfung der optischen Reinheit wurden 770 mg (0,002 Mol) des Cyanmethylesters durch Behandlung mit 3 ml Methanol und 2,5 ml n. NaOH verseift und das N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein (Ia) mit verdünnter Salzsäure ausgefällt: 689 mg (99%), nach Umkristallisieren aus Methylenechlorid-Petroläther Smp. 94–95°; $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,85$ in Äthanol).

N-Carbobenzoxy-S-benzyl-D,L-cystein-cyanmethylester: 6,9 g (0,02 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein, 40 ml abs. Essigester, 2,44 g (0,024 Mol) Triäthylamin und 2,26 g (0,03 Mol) Chloracetonitril wurden zusammen 5 Std. am Rückfluss gekocht. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden 7,8 g neutrales, kristallisierendes Öl erhalten. Nach dem Verreiben mit Äther verblieben 3,94 g (51%) farbloser Kristalle, Smp. 102–103°; aus der Mutterlauge wurden 1,71 g (22%) einer bei 62–65° schmelzenden Fraktion gewonnen. Nach Umkristallisation aus Methylenechlorid-Petroläther erwies sich

¹⁾ C. W. Roberts, I. c.

²⁾ Die Smp. sind korrigiert, Analysenpräparate wurden 4 bis 8 Std. bei 25 bis 60° und 0,01 mm Hg über P_2O_5 getrocknet.

die höher schmelzende Fraktion (Smp. 102–103°, $[\alpha]_D = 0^\circ$ [in Chloroform]) als racemischer Ester,

$C_{20}H_{20}O_4N_2S$	Ber. C 62,48	H 5,24	N 7,29	S 8,34%
	Gef., 62,52	,, 5,29	,, 7,35	,, 8,18%,

während die niedrig schmelzende Substanz (Smp. 67–68°) sich als identisch mit dem N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester erwies.

Die beiden Fraktionen wurden weiter durch Umsatz mit Benzylamin in der üblichen Weise charakterisiert. N-Carbobenzoxy-S-benzyl-DL-cystein-benzylamid, Smp. 118–119°.

$C_{25}H_{26}O_3N_2S$	Ber. C 69,10	H 6,03	N 6,45	S 7,38%
	Gef., 69,20	,, 6,16	,, 6,62	,, 7,60%

N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-benzylamid, Smp. 134–135°, $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,8$ in Chloroform).

Gef. C 69,13 H 6,26 N 6,52 S 7,27%

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-äthylester (IV): 11,5 g (0,005 Mol) L-Tyrosin-äthylester wurden in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran durch leichtes Erwärmen gelöst. Zur auf Zimmertemperatur gekühlten Lösung wurden 19,2 g (0,05 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester und 150 mg (0,0025 Mol) Eisessig (als Katalysator) zugegeben. Nach 48 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung in üblicher Weise neutral gewaschen. Der nach dem Verdampfen des Essigesters im Vakuum erhaltene Rückstand (30,45 g) wurde direkt verseift (s. unten).

Aus dem Rohprodukt konnte nach längerem Stehen einer Lösung in Äther bei –5° das Reaktionsprodukt als gelatineartiges Material isoliert werden, das nach mehrmaligem Umfällen aus Äther bei 103–104° schmolz; $[\alpha]_D^{22} = +26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,58$ in $CHCl_3$).

$C_{29}H_{32}O_6N_2S$	Ber. C 64,90	H 6,01	N 5,22%
	Gef., 64,83	,, 6,20	,, 5,31%

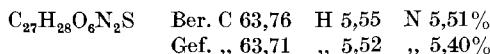
Da das feste Produkt jedoch infolge der gelatineartigen Eigenschaften nur mit maximal 50% Ausbeute erhalten werden konnte, wurde meistens auf dessen Isolierung verzichtet.

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester (V): 1,4 g (0,004 Mol) O-Benzoyl-L-tyrosin-äthylester-hydrochlorid wurden in 50 ml Äther suspendiert, auf 0° gekühlt und mit 4 ml n. NaOH unter Kühlung geschüttelt. Die Ätherlösung wurde getrocknet, auf ca. 3 ml eingeeignet und mit einer Lösung von 1,15 g (0,003 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester in 5 ml trockenem Essigester versetzt. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde das ausgeschiedene Reaktionsprodukt abfiltriert (0,64 g), und aus der Mutterlauge wurde nach der üblichen Aufarbeitung weiteres kristallines Material erhalten (0,99 g). Ausbeute 1,63 g (85%). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Alkohol: Smp. 164–166°; $[\alpha]_D^{23} = +26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,40$ in $CHCl_3$).

$C_{36}H_{36}O_7N_2S$	Ber. C 67,48	H 5,66	N 4,37%
	Gef., 67,28	,, 5,70	,, 4,30%

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin (VI): a) Aus (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-äthylester: Eine Lösung von 30,45 g rohem Ester (aus 0,05 Mol N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester) in einem Gemisch von 100 ml Methanol und 125 ml n. NaOH wurde 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von 50 ml 1-n. Salzsäure wurde das Methanol im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung unter Röhren bei 0° mit Salzsäure angesäuert, das ausgeschiedene Material abgetrennt (Smp. 185–189°) und aus wässrigerem Alkohol umkristallisiert: 17,9 g (72% ber. auf N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester): Smp.

199—201°; $[\alpha]_D^{22} = -17^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,90$ in Pyridin), $-8^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,80$ in Aceton), $+3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,77$ in n. NaOH).



Bei Verwendung von reinem Ausgangsmaterial (Smp. 103—104°) wurde eine Ausbeute von 81% erzielt.

b) Aus (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-benzoyl-L-tyrosin-äthylester: 280 mg dieses schwerlöslichen Esters wurden in 15 ml heissem Methanol gelöst und nach Kühlen auf Zimmertemperatur rasch mit 2 ml n. NaOH versetzt. Nach 2 Std. wurde aufgearbeitet wie unter a), wobei 195 mg (88%) Säure vom Smp. 189—192° erhalten wurde, die, aus wässrigerem Alkohol umkristallisiert, den gleichen Smp., Misch-Smp. und die gleiche Drehung wie das nach a) gewonnene Material zeigte.

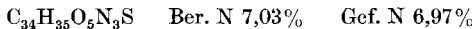
Die reduzierende Abspaltung der N-Carbobenzoxy- und S-Benzyl-Gruppen mittels Natrium in flüssigem Ammoniak nach *Harrington & Pitt*¹⁾ ergab L-Cysteinyl-L-tyrosin, dessen Drehung $[\alpha]_D^{22} = +16^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,09$ in n. HCl) mit den in der Literatur angegebenen Werten $[\alpha]_D^{25} = +15,2^{\circ 1)}$ und $+15,8^{\circ 2)}$ ($c = 5$ in n. HCl) gut übereinstimmte.

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-cyanmethylester (VII): Eine Suspension von 8,38 g (0,0165 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosin in 30 ml trockenem Essigester wurde mit 2,02 g (0,02 Mol) Triäthylamin und 2,27 g (0,03 Mol) Chloracetonitril versetzt und zum Sieden erhitzt; dabei trat rasch völlige Lösung ein, und nach ca. 15 Min. begann die Ausscheidung von Triäthylamin-hydrochlorid. Nach 2 und 4 Std. wurden je 0,5 g Triäthylamin zugegeben, und nach 5 Std. wurde gekühlt, das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und die Essigesterlösung in üblicher Weise neutral gewaschen und getrocknet (aus den alkalischen Auszügen wurden beim Ansäuern 0,41 g [5%] unverändertes Ausgangsmaterial regeneriert). Der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene ölige Rückstand wurde in wenig Aceton-Äther aufgenommen; bei längerem Stehen bei 0° schied sich der Cyanmethylester als gelatineartiges Material aus, das nach 2 Tagen abfiltriert und mit Äther gewaschen wurde. Das Rohprodukt vom Smp. 113—115° erwies sich als genügend rein für weitere Umsetzungen; Ausbeute 7,0 g (78%). Zur Analyse wurde dreimal aus Aceton-Äther umgefällt: Smp. 114—115°, $[\alpha]_D^{23} = -27^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,00$ in Eisessig), $0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,90$ in CHCl_3).



Zur Prüfung der optischen Reinheit wurde eine Probe des Esters mit methanolischer Natronlauge verseift. Die Drehung $[\alpha]_D^{22} = -17^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,92$ in Pyridin) der entstandenen Säure (Ausbeute 84%) stimmte mit derjenigen des Ausgangsmaterials überein.

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-benzylamid (VIIa): 0,55 g (0,001 Mol) (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-cyanmethylester und 0,14 g (0,0013 Mol) Benzylamin in 2 ml Essigester wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach etwa 1 Std. war die Reaktionslösung gelatineartig erstarrt, nach insgesamt 5 Std. wurde die Reaktionsmasse mit 5 ml Essigester verrieben und das feste, amorphe Material abfiltriert und reichlich mit Essigester gewaschen, 0,52 g (87%), Smp. 180—182°; nach Umkristallisieren aus Aceton Smp. 188—190°, $[\alpha]_D^{21} = -27^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,97$ in Eisessig).



N,O-Dicarbobenzoxy-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester: Eine Lösung von 5,86 g (0,012 Mol) N,O-Dicarbobenzoxy-L-tyrosin-cyanmethylester³⁾, 2,39 g (0,015 Mol)

¹⁾ Biochem. J. **38**, 417 (1944).

²⁾ C. W. Roberts & V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **204**, 871 (1953).

³⁾ R. Schwyzer, M. Feurer, B. Iselin & H. Kägi, Helv. **38**, 80 (1955).

L-Isoleucin-äthylester¹⁾ und 36 mg Eisessig (0,0006 Mol) in 8 ml trockenem Essigester wurde bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei sich das Reaktionsprodukt langsam in kristalliner Form ausschied. Nach 4 Tagen wurde das feste Material abfiltriert und mit Essigester gewaschen, 3,76 g (Smp. 155–158°); aus der Mutterlauge wurden nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Äther weitere 1,20 g (Smp. 149–152°) kristallines Produkt isoliert; total 4,96 g (70%, ber. auf aktiven Ester). Das Präparat wurde aus Äthanol umkristallisiert; 4,26 g (60%), Smp. 163–164°, $[\alpha]_D^{23} = +9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,32$ in CHCl_3), $+3,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,95$ in Eisessig).

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{N}_2$	Ber. C 67,10	H 6,49	N 4,74%
	Gef. „ 67,32	„ 6,47	„ 4,84%

L-Tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (IX): Eine Suspension von 4,13 g (0,007 Mol) N,O-Dicarbobenzoxy-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester in 80 ml trockenem Methanol wurde mit 0,007 Äquivalenten einer titrierten Lösung von Salzsäuregas in Methanol versetzt und in Gegenwart von 1 g Palladiumkohle (10% Pd) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert (unter Verwendung eines zweiten mit verd. Natronlauge gefüllten Hydriergefäßes zur Absorption des gebildeten Kohlendioxyds). Nach Aufnahme von etwas mehr als der berechneten Menge Wasserstoff kam die Hydrierung nach 2 Std. zum Stillstand. Die neutrale Reaktionslösung wurde darauf vom Katalysator abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Das als Öl erhaltene Hydrochlorid (2,64 g) wurde in 5 ml Wasser gelöst, wenig unlösliches Material wurde mit Essigester extrahiert und die klare wässrige Lösung bei 0° mit überschüssiger ges. Sodalösung alkalisch gestellt und mit Essigester extrahiert. Die getrockneten Essigester-Auszüge ergaben nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum 2,1 g (ber. 2,25 g) freien Ester als Öl, das sofort weiter umgesetzt wurde.

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-tetrahydropyranyl-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (XI): 5,76 g (0,015 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester, 5,80 g (ca. 0,014 Mol) roher O-Tetrahydropyranyl-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (X)²⁾ und 30 mg Eisessig wurden in 6,5 ml trockenem Essigester gelöst und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reaktionsprodukt schied sich allmählich als gelatineartiges Material aus, das nach 4 Tagen mit Äther gut verrieben und durch Filtration abgetrennt wurde (8,9 g, Smp. ca. 90°). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther wurden 6,73 g (65%, ber. auf O-Tetrahydropyranyl-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester) feine verfilzte Nadeln vom Smp. 143–145° erhalten. Kristallisation aus Methanol oder Äthanol veränderte diesen Smp. nicht weiter; $[\alpha]_D^{23} = -46^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,92$ in CHCl_3).

$\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{O}_8\text{N}_3\text{S}$	Ber. C 65,46	H 7,00	N 5,73%
	Gef. „ 65,18	„ 6,86	„ 5,67%

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (VIII): a) Eine Lösung von 12,58 g (0,023 Mol) (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosin-cyanmethylester (VII), 4,77 g (0,03 Mol) L-Isoleucinäthylester und 90 mg Eisessig in 20 ml Essigester wurde bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei das Reaktionsgemisch innert zwei Tagen gelatineartig erstarrte. Nach 4 Tagen wurde mit Äther verrieben, das feste Produkt abfiltriert und mit kaltem Essigester und Äther gewaschen (11,35 g, Smp. 138–145°); aus der Mutterlauge wurde nach üblicher Aufarbeitung weiteres Material (0,9 g) gewonnen. Einmaliges Umfällen aus Aceton-Äther ergab 11,0 g (74%, ber. auf aktiven Ester) des Tripeptidderivates vom Smp. 141–142°; $[\alpha]_D^{23} = -11^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,35$ in CHCl_3), $[\alpha]_D^{21} = -18^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,04$ in Eisessig). Zur Analyse wurde nochmals aus Aceton-Äther umgefällt.

$\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{N}_3\text{S}$	Ber. C 64,69	H 6,67	N 6,47%
	Gef. „ 64,45	„ 6,89	„ 6,43%

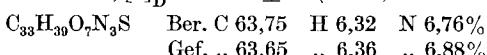
¹⁾ C. W. Roberts, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6203 (1954).

²⁾ Vgl. folgende, VI. Mitteilung über aktivierte Ester.

b) 2,88 g (0,0075 Mol) N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cystein-cyanmethylester (I), 2,10 g (ca. 0,0065 Mol) roher L-Tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (IX) und 18 mg Eisessig wurden in 5 ml trockenem Essigester gelöst und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Reaktionsprodukt schied sich langsam als gelatineartige Masse aus, die nach 4 Tagen mit Äther verrieben und abfiltriert wurde (2,36 g, Smp. 139—141°). Nach Umfällen aus Aceton-Äther 2,25 g (53%, ber. auf L-Tyrosyl-L-isoleucin-äthylester), Smp. 141—143° (keine Depression mit Material nach a)); $[\alpha]_D^{23} = -17^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,54$ in Eisessig).

c) 367 mg (0,0005 Mol) (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-O-tetrahydropyranyl-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester (XI) wurden in 5 ml heissem Äthanol gelöst, mit 3 ml 2-n. Salzsäure versetzt und 5 Min. auf 100° erhitzt. Beim Abkühlen schied sich ein bald fest werdendes Öl ab; nach Entfernen des Alkohols im Vakuum und Zugabe von etwas mehr Wasser wurde das feste Material gut verrieben und abfiltriert. Das Produkt 305 mg (94%), Smp. 142—144° (Misch-Smp. mit Ausgangsmaterial gibt Depression von ca. 12°; keine Depression mit Material nach a)), $[\alpha]_D^{23} = -18^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,01$ in Eisessig), erwies sich als identisch mit den nach a) und b) hergestellten Präparaten.

(N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin (XII): 6,49 g (0,01 Mol) (N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucin-äthylester wurden in 25 ml Methanol suspendiert, mit 30 ml n. Natronlauge versetzt (dabei klare Lösung) und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Methanol wurde darauf im Vakuum entfernt, die nur schwach getrübte wässrige Lösung bei 0° mit verd. Salzsäure angesäuert und das ausgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen. Die Essigester-Lösung wurde mit Wasser gewaschen, dann a) zweimal mit je 5 cm³ gesättigter Soda-Lösung und b) dreimal mit je 50 cm³ 0,1-n. Soda-Lösung extrahiert. Aus den Auszügen b) schied sich beim Ansäuern bei 0° ein festes, amorphes Material aus, das mit Wasser gewaschen und im Vakuum bei 30° getrocknet wurde. 4,2 g, Smp. 145—150° (die Auszüge a) ergaben nur ca. 20 mg einer festen Substanz, und aus der Essigesterlösung wurde als Neutralteil ca. 1 g eines stark riechenden Öls erhalten). Nach Umfällen aus Aceton-Äther wurden 3,32 g (53%) der Säure vom Smp. 162—164° erhalten. Durch zwei weitere Umfällungen wurde der Smp. auf 164—166° erhöht; $[\alpha]_D^{23} = -11^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,84$ in Eisessig).



Die Mikroanalysen wurden in unseren mikroanalytischen Laboratorien unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel ausgeführt.

SUMMARY.

A study on the synthesis of (N-carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosyl-L-isoleucine (XII) by the activated ester method has shown that the cyanomethyl esters prove useful for preparing relatively complicated peptides, especially if acetic acid is used as a catalyst. An important feature of the method is the fact that the cyanomethyl ester of (N-carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl)-L-tyrosine on hydrolysis or aminolysis produces derivatives of L-cysteinyl-L-tyrosine without any signs of racemisation.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.