

ROLF GEIGER, KARL STURM und WALTER SIEDEL

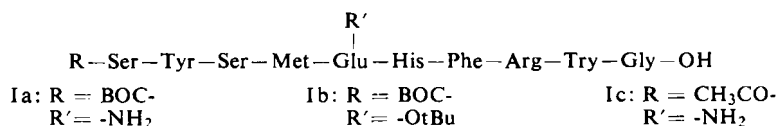
Synthese von Peptiden mit der Aminosäuresequenz 1—10 des Corticotropins

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt a. M.-Höchst

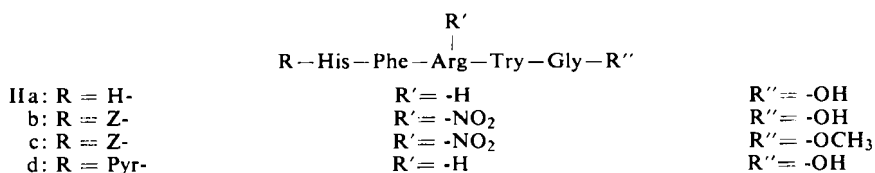
(Eingegangen am 11. Oktober 1962)

Die Darstellung der Hexapeptidderivate Z-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly-OH¹⁾ und Z-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Try-Gly-OH durch schrittweisen Aufbau der Peptidkette um je eine Aminosäure vom Carboxylende her wird beschrieben. Diese Hexapeptidderivate werden nach hydrogenolytischer Abspaltung der Carbobenzyloxygruppe mit BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-N₃ zu den entsprechenden Decapeptidderivaten mit der Aminosäuresequenz 1—10 des Corticotropins umgesetzt.

Die am Aminoende durch den tert.-Butyloxycarbonylrest²⁾ geschützten Decapeptidderivate Ia und Ib sowie zahlreiche als Zwischenprodukte dienende Peptidderivate wurden von R. SCHWYZER, H. KAPPELER und B. ISELIN³⁻⁷⁾ in mehreren Arbeiten beschrieben. K. HOFMANN und H. YAJIMA stellten das acetylierte Decapeptid Ic auf einem anderen Wege her⁸⁾.



Unsere Synthese führt zunächst, wie im folgenden beschrieben wird, vom carboxyl-endständigen Glycin-methylester unter schrittweisem Anbau je einer Aminosäure bis zum Pentapeptidderivat IIc.



1) Abkürzung der Aminosäurereste nach E. BRAND und J. T. EDSALL, *Annu. Rev. Biochem.* **16**, 223 [1947]; Großschreibung bedeutet L-Form. Z = Carbobenzyloxy = C₆H₅CH₂O·CO-; BOC = tert.-Butyloxycarbonyl = (CH₃)₃CO·CO-; tBu = tert.-Butyl = (CH₃)₃C-; Pyr = Pyroglutaminyl-.

2) L. A. CARPINO, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 98 [1957].

3) H. KAPPELER und R. SCHWYZER, *Experientia* [Basel] **16**, 415 [1960].

4) H. KAPPELER und R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **43**, 1453 [1960].

5) B. ISELIN und R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **44**, 169 [1961].

6) H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **44**, 476 [1961].

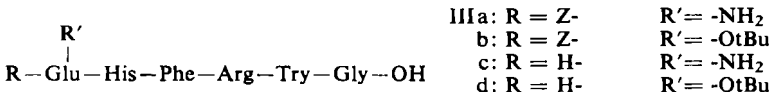
7) R. SCHWYZER und H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **44**, 1991 [1961].

8) *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2289 [1961].

Sie beginnt mit der Darstellung von Carbobenzoxy-L-tryptophyl-glycin-methylester nach der Methode der gemischten Anhydride⁹⁾. Dicyclohexylcarbodiimid (Abk. DCCI) als Kondensationsmittel¹⁰⁾ bewährte sich in diesem Falle weniger, da wir stets Ureid als Nebenprodukt erhielten. Doch führte die Anhydridmethode zu partiell racemisiertem Dipeptid, solange nur in organischen Lösungsmitteln gearbeitet wurde. Überraschenderweise trat keine Racemisierung ein, als das gemischte Anhydrid aus Carbobenzoxy-L-tryptophan und Chlorameisensäure-isobutylester in Tetrahydrofuran zur konzentrierten wäßrigen Lösung des Glycin-methylesters, hergestellt aus Glycin-methylester-hydrochlorid und Triäthylamin, gegeben wurde. Nach Hydrierung mit Palladiumschwarz als Katalysator¹¹⁾, Überführen in das Hydrochlorid¹²⁾ und Lyophilisieren hielt die Substanz noch beträchtliche Mengen Essigsäure fest, auch wenn anschließend bei 60° i. Vak. getrocknet wurde. Erst durch Umfällen aus Methanol/Äther wurde eine essigsäurefreie Verbindung erhalten, die für die Umsetzung mit Carbobenzoxy-nitro-L-arginin¹³⁾ nach der Carbodiimidmethode zum Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester geeignet war.

Abspaltung der Carbobenzoxygruppe mit HBr/Eisessig¹⁴⁾ führte zum Nitro-L-arginyl-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrobromid, das mit dem gemischten Anhydrid aus Carbobenzoxy-L-phenylalanin und Chlorameisensäure-äthylester zum bekannten Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester^{6, 12)} umgesetzt wurde.

Erneute Abspaltung der Carbobenzoxygruppe mit HBr/Eisessig und Reaktion des entstandenen Tetrapeptidester-dihydrobromids mit Carbobenzoxy-L-histidin-azid¹⁵⁾ ergab Carbobenzoxy-L-histidyl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester (IIc), der durch alkalische Verseifung in IIb übergeführt wurde. Diese Verbindung ließ sich durch Umkristallisieren aus Essigsäure/Wasser besonders einfach und wirksam reinigen. Katalytische Hydrierung ergab das freie Pentapeptid IIa, das auch von K. HOFMANN und H. YAJIMA bei der Synthese der Aminosäuresequenz 1–10 des Corticotropins eingesetzt wurde⁸⁾. Als Triäthylaminsalz lieferte es mit Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -azid- γ -amid¹⁶⁾ das Hexapeptidderivat IIIa, das erstmals von H. KAPPELER dargestellt wurde⁶⁾, mit Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -azid- γ -tert.-butylester das Hexapeptidderivat III b. Diese Verbindungen wurden durch katalytische Hydrierung in IIIc und III d übergeführt.



⁹⁾ J. R. VAUGHAN JR. und R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **74**, 676 [1952].

¹⁰⁾ K. HOFMANN, H. YAJIMA und E. T. SCHWARTZ, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1486 [1958].

¹¹⁾ J. TAUSZ und N. V. PUTNOKY, Ber. dtsh. chem. Ges. **52 II**, 1576 [1919].

¹²⁾ K. HOFMANN und S. LANDE, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2286 [1961].

¹³⁾ H. O. VAN ORDEN und E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **208**, 751 [1954].

¹⁴⁾ D. BEN-ISHAI und A. BERGER, J. org. Chemistry **17**, 1564 [1952].

¹⁵⁾ R. W. HOLLEY und E. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 [1954].

¹⁶⁾ E. SONDHEIMER und R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2816 [1954].

Empfindliche höhere Peptide sollten möglichst nur noch solche Schutzgruppen tragen, die unter milden Bedingungen abspaltbar sind. Diese Forderung erfüllt der tert.-Butyloxycarbonylrest²⁾. Von seiner Eigenschaft, schon bei kurzer Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure abgespalten zu werden, machten R. SCHWYZER und Mitarbb. bei der Synthese von corticotrop wirksamen Peptiden Gebrauch. Sie hatte auch uns bewogen, unsere Synthese auf Endprodukte abzustellen, die nur noch die unter den gleichen Bedingungen abspaltbaren BOC-Reste und gegebenenfalls tert.-Butylreste als Schutzgruppe enthalten. Die Hexapeptide IIIc und III d wurden deshalb mit tert.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin-azid⁵⁾ zu Ia und Ib umgesetzt. Diese Reaktion verlief im Falle III d \rightarrow Ib ohne Komplikationen und mit guter Ausbeute, wie vor einiger Zeit schon R. SCHWYZER und H. KAPPELER berichteten⁷⁾. Das freie Hexapeptid IIIc ist jedoch wegen des aminoendständigen Glutamins sehr empfindlich und geht bevorzugt in II d über⁶⁾. Wir konnten uns aber überzeugen, daß diese Konkurrenzreaktion durch rasches und vorsichtiges Arbeiten und durch Verwendung überschüssigen Azids zurückgedrängt wird. Dennoch war es notwendig, das Reaktionsprodukt Ia an Carboxymethylcellulose zu reinigen.

Wir danken Herrn Dr. H. H. SCHÖNE für die Ausführung und Auswertung der Aminosäureanalysen, Herrn Dr. P. HARTMANN für die Aufnahme von UV-Spektren und den Herren A. VOLK und F. BUROW für wertvolle experimentelle Mitarbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden im Schwefelsäurebad bestimmt und sind unkorrigiert. Für die aufsteigende Papierchromatographie auf Papier Nr. 2043 b der Fa. Schleicher & Schüll wurden folgende Lösungsmittelgemische benutzt:

System A: n-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (30 : 6 : 20 : 24)

System B: Methyläthylketon/Pyridin/Wasser (65 : 15 : 20)

System C: sek.-Butylalkohol/3-proz. Ammoniak (100 : 44)

System D: sek.-Butylalkohol/Isopropylalkohol/Chloressigsäure/Wasser (70 : 10 : 3 g : 40)⁶⁾

Die Laufzeit im System B war 6 Stdn., in den übrigen Systemen 16 Stdn.

1. *N-Carbobenzoxy-L-tryptophyl-glycin-methylester*: 33.8 g (0.1 Mol) *N-Carbobenzoxy-L-tryptophan*¹⁸⁾ werden in 300 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 14.0 ccm (0.1 Mol) *Triäthylamin* läßt man unter Rühren und guter Kühlung 13.7 g (0.1 Mol) *Chlorameisensäure-isobutylester* zutropfen, wobei die Innentemperatur bei -10° gehalten wird. Man läßt 10 Min. bei -10° stehen und gibt dann die Lösung unter kräftigem Rühren zur vorgekühlten Lösung von 16.2 g (0.13 Mol) *Glycinmethylester-hydrochlorid* und 17.5 ccm (0.126 Mol) *Triäthylamin* in 20 ccm Wasser. Man rührt noch $\frac{1}{2}$ Stde. bei Raumtemperatur und dampft dann i. Vak. zur Trockene ein. Der Rückstand wird zwischen Essigsäure und Wasser verteilt, die Essigesterphase wird mit 1 n HCl, 1 n NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. stark eingeengt. Den kristallinen Rückstand verreibt man mit Äther/Petroläther und saugt ab. Ausb. 30.2 g (74 % d. Th.). Schmp. 156–158° (Lit.¹⁰⁾: 158–159°). $[\alpha]_D^{25}$: $-11.0 \pm 0.5^{\circ}$ ($c = 3$, in Essigsäure) (Lit.¹⁰⁾: -11°).

2. *L-Tryptophyl-glycin-methylester-hydrochlorid*: Die nach K. HOFMANN und S. LANDE¹²⁾ hergestellte Verbindung, die noch Essigsäure enthält, wird in wenig Methanol gelöst und mit

¹⁷⁾ G. W. ANDERSON und F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 [1960].

¹⁸⁾ E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **175**, 39 [1948].

viel absol. Äther gefällt. Das zunächst harzig ausgefallene Produkt wird beim Verreiben mit frischem Äther pulvrig. Nach Trocknen i. Vak. über KOH Ausb. 90–92% d. Th.

3. *N^α-Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-hemihydrat*: 42.4 g (0.12 Mol) *N^α-Carbobenzoxy-nitro-L-arginin*¹³⁾ werden in 120 ccm Dimethylformamid gelöst. Gleichzeitig rührt man die Lösung von 31.2 g (0.1 Mol) *L-Tryptophyl-glycin-methylesterhydrochlorid* in 100 ccm Dimethylformamid mit 14.0 ccm (0.1 Mol) *Triäthylamin* während 30 Min. bei 0°, filtriert vom ausgefallenen Triäthylamin-hydrochlorid ab und vereinigt die beiden Lösungen. Nun verdünnt man mit 100 ccm Acetonitril und gibt bei –10° die vorgekühlte Lösung von 25.8 g (0.125 Mol) *DCCI* in 100 ccm Acetonitril zu. Man rührt noch 4 Stdn. bei –10° und läßt dann über Nacht bei +3° stehen. Am folgenden Tag versetzt man mit 1 ccm Eisessig, filtriert nach 1/4 Stde. vom Dicyclohexylharnstoff ab und engt die Lösung i. Vak. bei 40° zum Sirup ein. Dieser wird in einer Mischung von 1 l Essigester, 100 ccm Äthanol und 300 ccm Wasser aufgenommen. Die Essigesterphase wird abgetrennt und nacheinander mit 1 n HCl, 1 n NaHCO₃ und Wasser gewaschen, wobei man durch Zugabe von etwas Äthanol ein Ausfallen des Peptids verhindert. Nach dieser Reinigung bringt man die organische Phase i. Vak. zur Trockne. Beim Verreiben des harzigen Rückstandes mit Äther erhält man ein kristallines Produkt, das mit 300 ccm Essigester ausgekocht wird. Ausb. 43.2 g (71% d. Th.), Schmp. 123–125°; nach Umkristallisieren aus Äthanol schmilzt das an der Luft getrocknete Produkt bei 126–128°. $[\alpha]_D^{25}$: –25.8 ± 0.5° (*c* = 1.3, in Methanol).

$C_{28}H_{34}N_8O_8 \cdot 1/2 H_2O$ (619.6) Ber. C 54.5 H 5.7 N 18.1 Gef. C 54.7 H 5.9 N 18.2

4. *Nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrobromid-monohydrat*¹⁹⁾: 31.0 g (0.05 Mol) der *Carbobenzoxyverbindung* werden in 300 ccm Eisessig suspendiert. Man versetzt mit 120 ccm 6.25 n HBr in Eisessig, schüttelt einige Male um, bis alles gelöst ist und läßt unter Stickstoff eine Stde. bei Raumtemperatur stehen. Beim Versetzen mit absol. Äther fällt ein feinkörniges Produkt aus. Man fällt aus Methanol/Äther um und trocknet über P₂O₅ und KOH i. Vak. Ausb. 29.5 g (92.5% d. Th.). *R_f* (A) 0.78.

$C_{20}H_{28}N_8O_6 \cdot 2HBr \cdot H_2O$ (656.36) Ber. C 36.7 H 4.9 Br 24.4 N 17.1
Gef. C 36.9 H 5.2 Br 22.8 N 17.6

5. *N-Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-monohydrat*: 29.9 g (0.1 Mol) *N-Carbobenzoxy-L-phenylalanin*²⁰⁾ werden in 200 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 13.9 ccm (0.1 Mol) *Triäthylamin* läßt man unter Rühren bei –10° 10.9 g (0.1 Mol) *Chlorameisensäure-äthylester* zutropfen, rührt noch 10 Min. bei –10° und gibt dann unter kräftigem Rühren die auf 0° vorgekühlte Lösung von 65.6 g (0.1 Mol) *Nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrobromid-monohydrat* und 25.8 ccm (0.185 Mol) *Triäthylamin* in 200 ccm 50-proz. Dimethylformamid zu. Man rührt noch 1/2 Stde. bei Raumtemperatur und dampft dann die Lösungsmittel i. Vak. ab. Der Rückstand wird in feuchtem Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung wie üblich gewaschen. Beim Einengen unter Zusatz von Benzol scheidet sich das Tetrapeptid ab. Es wird durch Umkristallisieren aus Äthanol gereinigt. Ausb. 48.8 g (63% d. Th.), Schmp. 148 bis 150° (Lit.: 130–133°⁶⁾; 145–148° mit Sintern bei 125°¹²⁾). $[\alpha]_D^{25}$: –18.2 ± 0.5° (*c* = 1.5, in Methanol).

6. *L-Phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-dihydrobromid-monohydrat*: 7.76 g (10 mMol) der *Carbobenzoxyverbindung* werden in 70 ccm Eisessig gelöst. Nach Zugabe von 15 ccm 6.25 n HBr in Eisessig läßt man 1 Stde. unter Feuchtigkeitsausschluß stehen und fällt dann mit viel Äther das feinkörnige Reaktionsprodukt aus. Es wird gründlich

19) Vgl. Fußn. 11) in l. c. 12).

20) W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 [1958].

mit Äther gewaschen und zur Reinigung aus Methanol/Äther umgefällt. Ausb. 7.6 g (94.6% d. Th.). R_F (A) 0.90; R_F (D) 0.73.

$C_{29}H_{37}N_9O_7 \cdot 2HBr \cdot H_2O$ (803.67) Ber. Br 19.9 N 15.7 Gef. Br 18.1 N 16.0

7. *N α -Carbobenzoxy-L-histidyl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-monohydrat (IIc)*: 8.0 g (10 mMol) des vorstehenden *Tetrapeptid-methylester-dihydrobromid-monohydrats* werden in 70 ccm Dimethylformamid unter Zusatz von 2.52 ccm (18 mMol) *Triäthylamin* gelöst und bei 0° mit der auf 20 ccm eingedampften Lösung von *N α -Carbobenzoxy-L-histidin-azid* in Essigester, hergestellt aus 5.0 g (16.4 mMol) des *Hydrazids*¹⁵⁾, vereinigt. Nach 24stdg. Stehenlassen bei 0° wird das Reaktionsprodukt mit Wasser ausgefällt. Zur Reinigung fällt man aus Methanol/Wasser (1+1) und kristallisiert aus Methanol um. Ausb. 6.75 g (72.6% d. Th.). Schmp. 176–178° (Sintern bei 170°). $[\alpha]_D^{25}$: $-27.9 \pm 1^\circ$ ($c = 3$, in Dimethylformamid).

$C_{43}H_{50}N_{12}O_{10} \cdot H_2O$ (922.93) Ber. C 56.1 H 5.7 N 18.2 H₂O 1.9
Gef. C 56.2 H 5.9 N 18.2 H₂O 1.9

8. *N α -Carbobenzoxy-L-histidyl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-acetat-monohydrat (IIb)*: 9.2 g (10 mMol) des *Methylesters IIc* werden in 120 ccm 80-proz. Dioxan gelöst, mit 13 ccm 1*n* NaOH versetzt und nach 30 Min. langem Aufbewahren bei Raumtemperatur in 500 ccm Wasser gegossen, das 13.1 ccm 1*n* HCl enthält. Der Niederschlag wird abfiltriert. Zur Reinigung löst man in 30 ccm heißer Essigsäure und versetzt mit 30 ccm Wasser. Die Kristallisation beginnt fast augenblicklich. Das ausgefallene Produkt wird nach mehrstdg. Stehenlassen, zuletzt in Eiswasser, abfiltriert, mit Essigsäure/Wasser (1:1) und Wasser gewaschen und im Exsikkator über KOH und P₂O₅ getrocknet. Ausb. 8.1 g (82% d. Th.). Schmp. 226–228° (Zers.).

Das Produkt ist mit der von K. HOFMANN und S. LANDE¹²⁾ hergestellten Verbindung identisch bis auf den Gehalt an Essigsäure, der von den Trocknungsbedingungen abhängt. $[\alpha]_D^{25}$: $-26.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 3$, in Dimethylformamid).

$C_{42}H_{48}N_{12}O_{10} \cdot 1\frac{1}{2}CH_3CO_2H \cdot H_2O$ (989.4) Ber. N 17.0 CH₃CO₂H 9.12
Gef. N 17.0 CH₃CO₂H 9.6

9. *L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-monoacetat-dihydrat (IIa)*: Das nach K. HOFMANN und S. LANDE¹²⁾ durch katalyt. Reduktion der *Carbobenzoxyverbindung IIb* hergestellte *Pentapeptid* wird aus Methanol/Äther umgefällt und bei 60° i. Vak. getrocknet. R_F (A) 0.51; R_F (C) 0.62; R_F (D) 0.56.

$C_{34}H_{43}N_{11}O_6 \cdot CH_3CO_2H \cdot 2H_2O$ (797.9) Ber. CH₃CO₂H 7.5 H₂O 4.4
Gef. CH₃CO₂H 7.6 H₂O 4.5

$[\alpha]_D^{25}$: $-11.7 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, in 1*n* HCl) in guter Übereinstimmung mit der Literatur¹²⁾.

10. *N-Carbobenzoxy-L-glutaminy-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-hemiacetat-trihydrat (IIIa)*: Zur Lösung von 8.0 g (10 mMol) des *Pentapeptid-monoacetat-dihydrats IIa* und 1.4 ccm (10 mMol) *Triäthylamin* in 70 ccm Dimethylformamid, das 3% Wasser enthält, gibt man bei 0° 4.6 g (15 mMol) *N-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -azid- γ -amid*¹⁶⁾ und läßt 20 Stdn. bei 0° stehen. Zur Aufarbeitung fällt man mit 750 ccm Essigester 8.9 g Rohprodukt aus, das aus 50-proz. Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 7.0 g (67% d. Th.). Schmp. 200–202° (Zers.). $[\alpha]_D^{25}$: $-15.4 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig) (Lit.⁶⁾: $-15.9^\circ \pm 1.1^\circ$. R_F (A) 0.70.

$C_{47}H_{57}N_{13}O_{10} \cdot \frac{1}{2}CH_3CO_2H \cdot 3H_2O$ (1048)
Ber. C 55.2 H 6.3 N 17.4 CH₃CO₂H 2.9 H₂O 5.2
Gef. C 55.2 H 6.3 N 17.4 CH₃CO₂H 2.8 H₂O 5.1

Die quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl ergab: 1.03 Glu, 1.03 NH₃, 1.01 His, 0.98 Phe, 0.96 Arg, 0.99 Gly (Tryptophan wird bei der Hydrolyse zerstört).

11. *L-Glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-monoacetat-trihydrat (IIIc)*: 5.25 g (5 mMol) der *Carbobenzoxyverbindung IIIa* werden in 25 ccm 90-proz. Dimethylformamid gelöst. Man verdünnt mit 150 ccm 60-proz. Methanol, das 0.6 ccm Essigsäure enthält und leitet in Anwesenheit von Palladiumschwarz unter Vibromischung 2 Stdn. *Wasserstoff* durch die Lösung. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird sogleich i. Vak. bei 1 Torr und 30° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in etwas Wasser aufgenommen und sofort lyophilisiert. Das Hexapeptid, das 1 Mol. Essigsäure und 3 Moll. Wasser enthält, wird sogleich weiterverarbeitet.

12. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-sesquiacetat-trihydrat (Ia)*: 4.5 g (7.5 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin-hydrat*⁵⁾ werden in 15 ccm Tetrahydrofuran suspendiert und bei –10° nach Zugabe von 2.0 ccm 5*n* HCl einige Min. geschüttelt, bis alles gelöst ist. Nun werden 0.52 g (7.5 mMol) NaNO₂ in 5 ccm Wasser zutropft. Man schüttelt noch weitere 5 Min. bei –5°, gibt dann 150 ccm Essigester (–10°) und 30 ccm Eiswasser zu, trennt die Essigesterphase von der wäßr. Schicht, die teilweise gefroren ist, wäscht mit wenig eiskalter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet rasch über Na₂SO₄ und dampft den Essigester i. Vak. bei höchstens 0° ein, bis ein gallertiger Rückstand erscheint. Zu diesem Rückstand, der auf –5° gehalten wird, gibt man die eiskalte, mit 0.7 ccm (5 mMol) *Triäthylamin* versetzte Lösung von 4.73 g (5 mMol) des frisch hergestellten *Hexapeptidacetats IIIc* in 60 ccm Dimethylformamid und läßt 20 Stdn. bei 0° stehen.

Dann verdünnt man mit 200 ccm Methanol, versetzt mit 300 ccm 0.5-proz. Essigsäure und gibt die opaleszierende Lösung auf eine mit 60 g Carboxymethylcellulose beschickte Säule. Man wäscht zunächst mit 2 / 0.001 *m* Ammoniumacetat und eluiert mit steigendem Puffergradienten von 0.001–0.1 *m* Ammoniumacetat, wobei der Gehalt an Peptiden in den jeweils 0.5 l fassenden Fraktionen durch Messen der Extinktion bei 270–280 m μ ermittelt wird. Das *BOC-Decapeptid* erscheint bei etwa 0.01 *m* Puffer. Man vereinigt die entsprechenden Fraktionen und lyophilisiert. Ausb. 3.15 g (40.5% d. Th.). $[\alpha]_D^{20}$: $-21 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$, in 90-proz. Essigsäure). (Lit.⁷⁾: $-21.8 \pm 1.7^\circ$ ($c = 0.321$, in Eisessig). R_F (A) 0.78; R_F (D) 0.77.



Ber. C 52.2 H 6.5 N 15.43 CH₃CO₂H 5.8

Gef. C 52.3 H 6.5 N 15.6 CH₃CO₂H 5.8

Die quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl ergab: 1.92 Ser, 1.00 Tyr, 0.97 Met, 1.08 Glu, 1.10 NH₃, 0.98 His, 1.00 Phe, 1.00 Arg, 0.99 Gly (Tryptophan wird bei der Hydrolyse zerstört).

13. *N-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -methylester- γ -tert.-butylester*²¹⁾: 29.5 g (0.1 Mol) *N-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -methylester* (Herstellung wie für den Äthylester beschrieben²²⁾; Schmp. des Dicyclohexylamin-Salzes 171–173°²³⁾ werden in 200 ccm Methylenchlorid gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 1 ccm konz. Schwefelsäure und leitet bei –50° 100 ccm *Isobutylen* ein^{7, 17)}. Nach dreitägigem Aufbewahren in einer Druckflasche bei Raumtemperatur kühlt man auf 0°, versetzt mit 100 ccm eiskalter gesätt. Natriumhydrogencar-

²¹⁾ E. KLIEGER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **655**, 195 [1962], und zwar S. 201.

²²⁾ F. WEYGAND und K. HUNGER, Z. Naturforsch. **13b**, 50 [1958].

²³⁾ E. KLIEGER, E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **640**, 157 [1961].

bonatlösung und verdampft überschüss. Isobutylene i. Vak. Die Methylenchloridphase wird gründlich mit 1 *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft, wobei ein Öl zurückbleibt. Ausb. 31.2 g (89% d. Th.).

14. *N*-Carbobenzoxy-*L*-Glutaminsäure- γ -*tert*-butylester- α -hydrazid²¹⁾: 35.1 g (0.1 Mol) des vorstehenden Esters werden in einer Mischung von 250 ccm Methanol und 15 ccm (0.3 Mol) *Hydrazinhydrat* gelöst. Nach 2 Tagen bei 0° bringt man i. Vak. zur Trockene, nimmt wieder in wenig Methanol auf und versetzt mit der mehrfachen Menge Essigester. Nachdem man das Methanol, zusammen mit etwas Essigester, abdestilliert hat, fällt ein geringer Niederschlag aus, von dem abfiltriert wird. 0.54 g Dihydrazid vom Schmp. 181–183°.

Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand mit 150 ccm Äther verrührt. Bald erstarrt die opaleszierende Lösung zur Gallerte. Nun fügt man noch 150 ccm Petroläther (30–50°) zu, läßt einige Stdn. bei 0° stehen und preßt dann scharf vom Lösungsmittel ab. Die Verbindung wird 2 Tage im evakuierten Exsikkator über H₂SO₄ und Paraffinschnitzeln aufbewahrt. Ausb. 25.3 g (72.5% d. Th.). Schmp. 78–79°. $[\alpha]_D^{20}$: $-20.0 \pm 1^\circ$ ($c = 3$, in Methanol).

C₁₇H₂₅N₃O₅ (351.4) Ber. C 58.1 H 7.2 N 12.0 Gef. C 58.2 H 7.4 N 11.8

15. *N*-Carbobenzoxy-*L*-glutamyl-(γ -*tert*-butylester)-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-acetat-trihydrat (IIIb): 5.8 g (16.5 Mol) des vorstehenden *Hydrazids* werden in 25 ccm eiskalter 1 *n* HCl, die mit 50 ccm Essigester übersichtet ist, gelöst. Man tropft die Lösung von 1.16 g (16.8 mMol) *Natriumnitrit* in 5 ccm Wasser zu und schüttelt noch 5 Min. bei –3 bis –1°. Nach Trennung der Schichten extrahiert man die wäßr. Phase nochmals mit 30 ccm Essigester (–5°), wäscht die vereinigten Essigesterlösungen mit eiskaltem 0.5 *n* NaHCO₃ und Wasser, trocknet rasch über etwas Natriumsulfat und dampft i. Vak. unterhalb von 0° auf ein kleines Vol. ein. Hierzu gibt man die eiskalte Lösung von 8.0 g (10 mMol) *I*a und 1.4 ccm (10 mMol) *Triäthylamin* in 60 ccm Dimethylformamid, das 3% Wasser enthält, und läßt 24 Stdn. bei 0° stehen. Dann wird nach Zugabe von 2 ccm Essigsäure mit 800 ccm Essigester ein gallertiges Rohprodukt gefällt (9.2 g), das aus 60-proz. Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 7.2 g (63.5% d. Th.). Schmp. 200–202° (Zers.). R_F (A) 0.90; R_F (C) 0.93; R_F (D) 0.87.

Nach Abspaltung des *tert*-Butylrestes mit Trifluoressigsäure: R_F (A) 0.70; R_F (C) 0.54; R_F (D) 0.79. $[\alpha]_D^{25}$: $-16.7 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.5$, in Dimethylformamid).

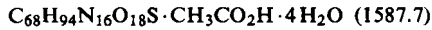
C₅₁H₆₄N₁₂O₁₁·CH₃CO₂H·3H₂O (1135.2) Ber. C 56.2 H 6.6 N 14.8 CH₃CO₂H 5.3
Gef. C 56.3 H 6.6 N 14.9 CH₃CO₂H 5.5

16. *L*-Glutamyl-(γ -*tert*-butylester)-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-acetat-dihydrat (IIIId): Die *Carbobenzoxyverbindung* IIIb wird in der 30fachen Menge eines Gemisches aus 50 Tln. Methanol, 45 Tln. Wasser und 5 Tln. Essigsäure in Anwesenheit von Palladiumschwarz unter Durchleiten von *Wasserstoff* 3 Stdn. hydriert. Man bringt i. Vak. zur Trockene, nimmt den Rückstand in etwas Wasser auf, lyophilisiert und trocknet i. Vak. über KOH bei Raumtemperatur. Ausb. 94% d. Th. R_F (A) 0.66; R_F (C) 0.69; R_F (D) 0.64. $[\alpha]_D^{20}$: $-13.5 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid).

C₄₃H₅₈N₁₂O₉·CH₃CO₂H·2H₂O (983.1) Ber. CH₃CO₂H 6.1 H₂O 3.7
Gef. CH₃CO₂H 5.9 H₂O 3.8

17. *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*L*-seryl-*L*-methionyl-*L*-glutamyl-(γ -*tert*-butylester)-*L*-histidyl-*L*-phenylalanyl-*L*-arginyl-*L*-tryptophyl-glycin-acetat-tetrahydrat (*Ib*)⁷⁾: Aus 4.5 g (7.5 mMol) *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*L*-seryl-*L*-methionin-hydrazid wird, wie unter 12. beschrieben, das *Azid* bereitet. Zu dem nach dem Abdampfen der Essigester-

lösung gallertigen Rückstand gibt man die eiskalte Lösung von 4.9 g (5 mMol) *III d* und 0.7 ccm (5 mMol) *Triäthylamin* in 100 ccm Dimethylformamid, schüttelt kurz, bis alles gelöst ist, und läßt 24 Stdn. bei 0° stehen. Dann versetzt man mit 5 ccm Eisessig und fällt mit 1.4 l Essigester ein Rohprodukt aus (7.6 g), das aus 500 ccm 80-proz. Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 5.8 g (72.6% d. Th.). Schmp. 201–204° (Zers.). $[\alpha]_D^{25}$: $-13.0 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid). Lit.⁷⁾: $-12.4 \pm 0.8^\circ$ ($c = 1.328$, in Dimethylformamid). R_F (B) 0.77; R_F (C) 0.89. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure: R_F (A) 0.41; R_F (D) 0.58.



Ber. C 51.5 H 6.0 N 14.1 CH₃CO₂H 3.8 H₂O 4.5

Gef. C 51.4 H 6.0 N 14.2 CH₃CO₂H 3.8 H₂O 4.6