

KARL STURM, ROLF GEIGER und WALTER SIEDEL

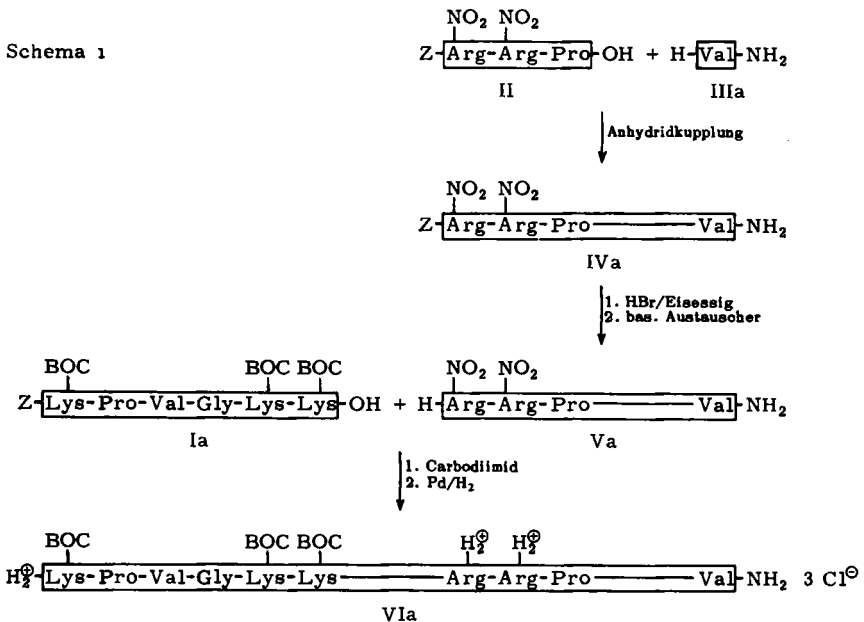
Synthese von Peptidderivaten mit den Aminosäuresequenzen 11–20, 11–21, 11–22 und 11–23 des Corticotropins (ACTH)

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vorm. Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)

(Eingegangen am 11. Oktober 1963)

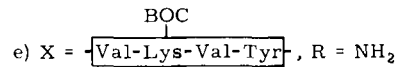
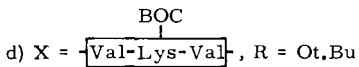
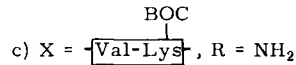
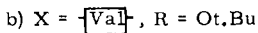
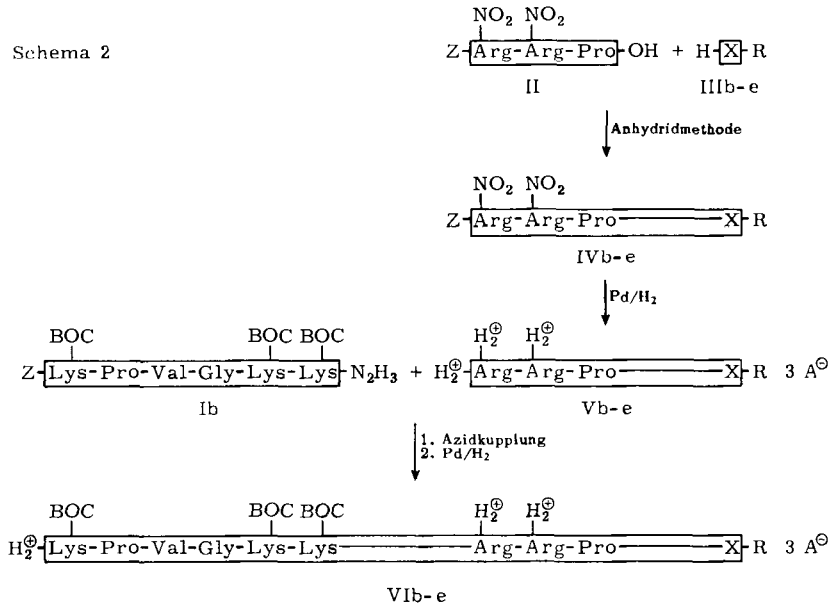
Folgende Peptide (sämtlich L-Konfiguration), deren Aminogruppen in der Seitenkette des Lysins durch die tert.-Butyloxycarbonylgruppe geschützt sind, werden dargestellt: Das Decapeptidamid und der Decapeptid-tert.-butylester mit der Sequenz 11–20, das Undecapeptidamid mit der Sequenz 11–21, der Dodecapeptid-tert.-butylester mit der Sequenz 11–22 und das Tridecapeptidamid mit der Sequenz 11–23 des Corticotropins. Sie sind geeignete Zwischenprodukte zur Synthese corticotrop wirksamer Eicosa- bis Tricosapeptide.

In einer früheren Veröffentlichung¹⁾ haben wir die Darstellung des an den ε-Aminogruppen des Lysins durch tert.-Butyloxycarbonylgruppen geschützten Tetradecapeptidamids mit der Aminosäuresequenz 11–24 des Corticotropins beschrieben. In Anlehnung an das dort angewandte Aufbauprinzip und unter Verwendung der dort beschriebenen Zwischenprodukte mit den Formeln Ib, II, VII und VIII wurden nun gemäß Schema 1 und 2 die Deca- bis Tridecapeptidderivate VIa bis VIe dargestellt.



¹⁾ K. STURM, R. GEIGER und W. SIEDEL, Chem. Ber. 96, 609 [1963].

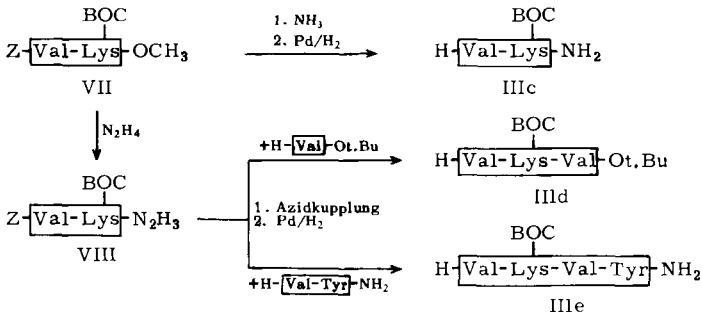
Schema 2

A[⊖] = Cl[⊖] bzw. CH₃COO[⊖]

Z = Carbobenzyoxy-, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl-, t.Bu = tert.-Butylrest

Von den Aminosäurekomponenten der Formel III waren Valin-tert.-butylester (III b)²⁾ und Valinamid (III a)³⁾ bereits bekannt. Für die Darstellung des Amids in präparativem Maßstab ist die von SMITH und Mitarbb.³⁾ beschriebene Ammonolyse von Valin-

Schema 3

2) G. W. ANDERSON und F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 [1959].3) E. L. SMITH, D. H. SPACKMANN und W. J. POLGLASE, J. biol. Chemistry **199**, 801 [1952].

methylester wenig geeignet. Wir haben daher *N*-Carbobenzoxy-valin nach der Methode der gemischten Anhydride in das Amid übergeführt und nachfolgend den Carbobenzoxyrest durch katalytische Hydrierung entfernt. Die übrigen Basen IIIc–IIIe wurden gemäß Schema 3 gewonnen.

Nach Schema 1 und 2 wurde in erster Stufe jeweils das Tripeptidderivat II als gemischtes Anhydrid mit den Aminkomponenten der Formeln IIIa–IIIe umgesetzt. Als Lösungsmittel für II bewährte sich ein Gemisch von wasserfreiem Dioxan/Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (3:3:1).

Nach dem üblichen Abtrennen nicht umgesetzter Ausgangskomponenten waren die Kupplungsprodukte IVa–IVe chromatographisch weitgehend einheitlich, so daß auf eine weitere Reinigung durch Kristallisation verzichtet wurde.

Das Tetrapeptidderivat IVa enthält außer dem Carbobenzoxyrest keine säurelabilen Schutzgruppen mehr. Für die Kettenverlängerung bot sich in diesem Falle als Verfahrensvariante das Schema 1 an. Unter Erhaltung der beiden Nitroguanidino-Gruppierungen wurde die α -Aminogruppe durch HBr-Spaltung in Eisessig freigelegt. Nach Kondensation mit dem Hexapeptidderivat Ia mittels Dicyclohexylcarbodiimids folgte dann auf der Decapeptidstufe die gleichzeitige Eliminierung von Nitrogruppen und Carbobenzoxyrest durch katalytische Hydrierung.

In den Zwischenprodukten IVb–IVe dagegen läßt sich der Carbobenzoxyrest nicht selektiv abspalten. Sie wurden nach Schema 2 umgesetzt und zunächst katalytisch mit Palladiummohr hydriert. Als Lösungsmittel diente 90-proz. Methanol, das etwas mehr als die zum Neutralisieren des gebildeten Ammoniaks und der freigelegten Amino- und Guanidinogruppen erforderliche Menge Essigsäure enthielt oder auch 90-proz. Essigsäure. Die erhaltenen Basen der Formeln Vb–Ve wurden dann als Dihydrochloride oder Diacetate in 90-proz. Tetrahydrofuran mittels der Azidmethode mit überschüssigem Hexapeptidderivat der Formel Ib kondensiert und in letzter Stufe der Carbobenzoxyrest durch katalytische Hydrierung abgespalten.

Für die Reinigung der stark basischen Peptidderivate der allgemeinen Formeln V und VI bewährte sich wiederum die Chromatographie an Carboxymethylcellulose. Bei der Gradientenelution von der Säule mit Ammoniumacetatpuffer wurden durch einen bis zu 0.10 *m* Puffer ausschließlich Nebenprodukte entfernt. Die Molaritätsspannen, innerhalb derer dann die Vertreter der Gruppen V und VI vom Austauschereisorbiert werden, hängen vom Verhältnis Peptid:Austauscher, der Elutionsgeschwindigkeit und auch von der Wahl des Molaritätsgradienten ab. Werden nicht gerade extreme Bedingungen gewählt, so kann als allgemeine Regel gelten, daß Peptide der Formel VI im 0.10–0.16 *m* und Peptide der Formel V im 0.16–0.22 *m* Eluat erscheinen. Bei gleicher Zahl basischer Gruppen wird also das Peptid mit dem niedrigeren Molekulargewicht stärker durch die Carboxymethylcellulose adsorbiert.

Kleinere Mengen V und VI (bis zu 5 g) lassen sich auch durch kontinuierliche, trägerfreie Hochspannungselektrophorese in einem Ammoniumacetat-Essigsäurepuffer von pH 5 (Elphor VaP-Apparatur der Fa. Bender & Hobein, München) reinigen. Erwartungsgemäß werden die Verbindungen der Formel V stärker abgelenkt als die höhermolekularen Basen der Formel VI.

Die Endprodukte sind nach der Gefriertrocknung amorph. Der analytisch ermittelte Wassergehalt kann daher nicht einem stöchiometrischen Verhältnis entsprechen und wurde bei der Auswertung der Analysen auf 0.5 Val abgerundet.

Herrn Dr. H. H. SCHÖNE danken wir für die Ausführung und Auswertung der Aminosäureanalysen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte der Verbindungen wurden im Kupferblock bestimmt und sind unkorrigiert. Für die aufsteigende Papierchromatographie auf Papier Nr. 2043 b der Fa. Schleicher & Schüll wurde das Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (30:6:20:24) benutzt. R_F -Werte hinter dem Symbol $\xrightarrow{\text{TFE}}$ beziehen sich auf die in üblicher Weise mit wasserfreier Trifluoressigsäure von tert.-Butyl- und tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppen befreiten Substanzen. Bei R_F -Angaben von Rohprodukten ist der dem Hauptprodukt entsprechende Wert kursiv gesetzt.

Zur Säulenchromatographie wurde eine Carboxymethylcellulose der Fa. Whatman (CM 70 powder) verwendet. Das Verhältnis Durchmesser:Höhe der Säulen lag im Mittel bei 0.20. Die Elution wurde bei tyrosinhaltigen Peptiden UV-spektrometrisch (kontinuierliche Absorptionsmessung bei 254 μ mit dem Uvicord 4701 A der LKB Produkter AB, Stockholm), bei den übrigen chromatographisch verfolgt.

Alle eingesetzten Aminosäuren gehören der L-Reihe an.

A. Decapeptidderivat VIa

1. *Valinamid-hydrochlorid (IIIa-HCl)*: In die Lösung von 251 g *N*-Carbobenzoxy-valin (1 Mol) und 138 ccm Triäthylamin in 2 l absol. Tetrahydrofuran werden bei -10° unter Rühren im Abstand von 5 Min. 96 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* und 100 ccm *flüss. Ammoniak* auf einmal eingetragen. Sofort anschließend dampft man die Mischung ein und verreibt den Rückstand mit 1 l 1 *n* NaHCO₃. Das ungelöste *N*-Carbobenzoxy-valinamid wird nachfolgend aus 90-proz. wäbr. Methanol umkristallisiert. Ausb. 180 g (72% d. Th.), Schmp. 203–204°.

125 g des fein gepulverten Amids (0.5 Mol) verreibt man mit 1.0 l Methanol und leitet nach Zugabe von 10 g Palladiummohr unter Vibromischung einen lebhaften Wasserstoffstrom durch die Suspension, bis eine klare Lösung entstanden und die Kohlendioxidentwicklung beendet ist. Nach Abtrennen des Katalysators wird die Lösung mit 0.5 l 1 *n* methanolischer HCl versetzt und auf dem Wasserbad bis zur beginnenden Kristallisation eingengt. Nach mehrstündigem Kühlen in Eiswasser saugt man das *Valinamid-hydrochlorid* ab, wäscht mit wenig Methanol und trocknet auf dem Dampfbad. Durch Einengen der Mutterlauge wird noch eine zweite Fraktion gewonnen. Gesamtausbeute 60 g (78% d. Th.), Zers.-P. 252°, $[\alpha]_D^{20}$: $+29.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

2. *N^α-Carbobenzoxy-N^ω-nitroarginyl-N^ω-nitroarginyl-prolyl-valinamid (IVa)*: 26.1 g II¹ (40 mMol) löst man unter Erwärmen in 100 ccm Dimethylformamid und verdünnt die Lösung mit je 300 ccm absol. Dioxan und Tetrahydrofuran. Nach Zugabe von 5.50 ccm Triäthylamin kühlt man die Mischung auf -10° ab und gibt unter Vibromischung 3.90 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* und 10 Min. danach die eiskalte Lösung von 6.85 g IIIa (45 mMol) in 45 ccm 1 *n* NaOH zu. Man läßt noch 1 Stde. bei Raumtemperatur reagieren und dampft dann die Reaktionsmischung unterhalb von 60° i. Vak. ein. Das harzige Rohprodukt wird durch Umfällen aus Äthanol/1 *n* NaHCO₃ (1:10) gereinigt, dekantierend mit Wasser gewaschen und bei 60°/1 Torr über KOH bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 13.6 g eines amorphen, schwach gelblichen Pulvers (45% d. Th.), $R_F = 0.94$.

3. *N^ω-Nitroarginyl-N^ω-nitroarginyl-prolyl-valinamid (Va)*: 13.5 g fein gepulvertes *Iva* (18 mMol) werden mit 50 ccm einer 37-proz. Lösung von HBr in Eisessig bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist (ca. 30 Min.). Sofort anschließend fällt man das *Hydrobromid von Va* mit 0.4 l absol. Äther in pulveriger Form aus, saugt ab und verteilt das stark hygroskopische Produkt sofort zwischen 0.1 l Äther und 0.5 l Wasser. Die wäßrige Phase wird durch portionsweises Einrühren von stark basischem Austauschler (IRA 410 von Röhm & Haas) von Bromionen befreit und lyophilisiert. Ausb. 8.6 g eines farblosen Pulvers (77% d. Th.), $R_F = 0.58$.



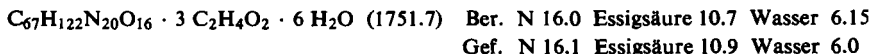
4. *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysin (Ia)*: 11.1 g des *Methylesters von Ia* (10 mMol) löst man in einer Mischung von 150 ccm Dioxan und 90 ccm Wasser und gibt zu der Lösung 13 ccm 1 n NaOH. Nach 2 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird die Mischung mit verd. Salzsäure auf pH 8 eingestellt, unterhalb von 40° i. Vak. auf ein Drittel eingengt und mit 1.0 l Wasser verdünnt. Zu der filtrierten Lösung gibt man 30 ccm 1 m Citronensäure und schüttelt das harzig abgeschiedene Verseifungsprodukt in 0.3 l Essigester. Die mit Wasser gewaschene und getrocknete Essigesterlösung engt man dann auf ein kleines Volumen ein und gießt das Konzentrat unter intensivem Rühren in 0.5 l Petroläther. Die pulverige Fällung wird nach dem Waschen mit Petroläther zunächst an der Luft, dann bei 60°/1 Torr getrocknet. Ausb. 7.9 g (73% d. Th.), Zers.-P. 70°, $[\alpha]_D^{20}$: $-48.9 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1$, Methanol), $R_F = 0.97 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.39$.



5. *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valinamid-trihydrochlorid (VIa)*: 10.90 g *Ia* (10 mMol) und 6.16 g *Va* (10 mMol) löst man in 240 ccm Acetonitril/Dimethylformamid (3 : 1), gibt bei -10° 2.48 g Dicyclohexylcarbodiimid (11 mMol) in 20 ccm Acetonitril zu und beläßt die Mischung über Nacht bei $+5^\circ$. Nach Abtrennen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs zieht man das Lösungsmittel unterhalb von 60° i. Vak. ab, löst den amorphen Rückstand ($R_F = 0.93/0.55 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.35/0.45/0.55$) in 0.4 l 90-proz. Essigsäure und leitet in Gegenwart von 3 g Palladiummohr unter Vibromischung Wasserstoff durch die Lösung, bis die Kohlendioxidentwicklung beendet ist. Nach Zugabe von 3 g frischem Katalysator wird dann über Nacht in der Schüttelente weiterhydriert. Die vom Palladium abgetrennte Lösung engt man unterhalb von 30° im Rotationsverdampfer stark ein, verdünnt mit 0.4 l Wasser und lyophilisiert. Ausb. 16.8 g farbloses Pulver; $R_F = 0.89/0.33 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.11/0.33/0.45$.

Bei der Reinigung des Rohproduktes durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose (200 g) in Ammoniumacetatpuffer (Molaritätsgradient 0.02–0.22) erscheint das gewünschte Peptid im ca. 0.14–0.16 m Eluat und liegt nach wiederholtem Lyophilisieren als *Triacetat-hexahydrat* vor. Ausb. 6.15 g (35% d. Th.), $R_F = 0.89 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.11$, $[\alpha]_D^{20}$: $-67.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

Quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl: 2.93 Lys, 2.00 Arg, 2.03 Pro, 1.87 Val, 0.92 Gly.

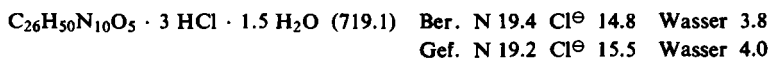


Zur Überführung in das Trihydrochlorid versetzt man das Triacetat mit der 0.24fachen Menge Triäthylamin-hydrochlorid (3.15 Val) und lyophilisiert zweimal mit je 0.1 l Wasser.

B. Decapeptidderivat *V1b*

1. *Arginyl-arginyl-prolyl-valin-tert.-butylester-trihydrochlorid (Vb)*: In die gemäß A. 2. bereitete Lösung des gemischten Anhydrids von 26.1 g *II* (40 mMol) gibt man bei -10° unter Vibromischung die eiskalte Lösung von 15.2 g *Valin-tert.-butylester*²⁾ (44 mMol) in 40 ccm Dimethylformamid. Sofort anschließend wird die Reaktionslösung i. Vak. auf etwa 100 ccm eingengt und das Konzentrat mit 1 / 0.5 *n* NaHCO₃ durchgeschüttelt. Das ausgefällte Harz (ca. 30 g, $R_F = 0.95 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.92$) wird in 0.4 / 90-proz. Essigsäure nach Zugabe von 3 g Palladiummohr bis zur beendeten Kohlendioxydentwicklung in offener Apparatur (vgl. A. 1.) und nach Zugabe von 2 g frischem Katalysator noch 18 Stdn. in der Schüttelente hydriert. Nach Einengen der Lösung unterhalb von 30° im Rotationsverdampfer, Verdünnen mit 0.4 / Wasser und Filtration wird lyophilisiert. Man erhält 15.0 g eines rohen Triacetats, das aufgrund des Chromatogramms noch 3 Nebenprodukte enthält ($R_F = 0.39/0.52/0.63/0.76$), die zusammen etwa 10 % ausmachen.

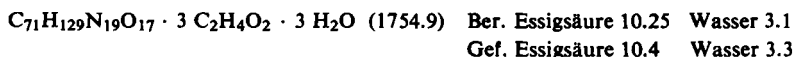
Zur weiteren Reinigung dient die Chromatographie an 300 g Carboxymethylcellulose, die analog A. 5. ausgeführt wird. Das reine Triacetat löst man zuletzt in 0.2 / Wasser, stellt die Lösung bei 0° mit 1 *n* HCl auf pH 2.2 ein und lyophilisiert. Nach wiederholtem Lyophilisieren mit 0.1 / Wasser liegt das Peptid als *Trihydrochlorid-sesquihydrat* (mit ca. 0.15 Val freier HCl) vor. Ausb. 12.5 g (43 % d. Th.), $R_F = 0.63 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.33$.



2. *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valin-tert.-butylester-trihydrochlorid (V1b)*: Zu der Lösung von 11.05 g *Ib* (10 mMol) in 130 ccm 90-proz. wäbr. Tetrahydrofuran gibt man bei Raumtemperatur 11.0 ccm wäbr. 1 *m* NaNO₂. In die auf 0° abgekühlte Mischung tropft man dann unter Rühren innerhalb einer Min. 11.0 ccm 1 *n* HCl und nach 2 Min. weitere 10.0 ccm 1 *n* HCl ein. Man läßt noch 5 Min. bei 0° reagieren und neutralisiert dann die überschüssige Salzsäure durch Zugabe von 1.40 ccm Triäthylamin. Zu der Azidlösung, deren Temperatur immer noch 0° betragen soll, gibt man sofort anschließend die eiskalte Mischung von 5.05 g *Vb* (7 mMol), 50 ccm Dimethylformamid und 1.17 ccm Triäthylamin (8.5 mMol). Nach zweitägigem Aufbewahren bei 0° wird die Reaktionslösung eingedampft und der harzige Rückstand in üblicher Weise in 1 / Methanol in Gegenwart von 3 g Palladiummohr bis zur beendeten Kohlendioxydentwicklung hydriert. Nach dem Eindampfen der Lösung befreit man das Rohprodukt ($R_F = 0.96/0.63 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.10/0.18/0.33/0.44$) durch Aufnehmen in 0.4 / 2-proz. Essigsäure und Lyophilisieren von schwerer löslichen Begleitstoffen (ca. 20 %) und reinigt es dann weiter durch Chromatographie an einer Säule von 100 g Carboxymethylcellulose in Ammoniumacetatpuffer (Elutionsgradient 0.04–0.18 *m*). Das Hauptprodukt erscheint im ca. 0.14–0.16 *m* Eluat und liegt nach dreimaligem Lyophilisieren als *Triacetat-trihydrat* vor. Ausb. 4.45 g (36 % d. Th.), $R_F = 0.96 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.10$, $[\alpha]_D^{25} = -76.3 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

Quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl:

2.95 Lys, 2.04 Arg, 2.04 Pro, 1.93 Val, 1.00 Gly.



Zur Überführung in das entsprechende Trihydrochlorid wird mit der 0.24-fachen Gewichtsmenge Triäthylamin-hydrochlorid (3.15 Val) lyophilisiert.

C. Undecapeptidderivat VIc

1. *Valyl-N^ε-BOC-lysynamid (IIIc)*: Die Lösung von 50 g VII¹) (0.1 Mol) in 0.8 l Methanol sättigt man bei -5° mit *Ammoniak* und beläßt sie gasdicht verschlossen 4 Tage bei Raumtemperatur. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird das in fester Form anfallende *N-Carbobenzoxy-valyl-N^ε-BOC-lysynamid* aus 90-proz. wäbr. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 35 g (73 % d. Th.), Schmp. 200°, $R_F = 0.97 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.90$.

$C_{24}H_{38}N_4O_6$ (478.6) Ber. N 11.7 Gef. N 11.9

24 g dieses Carbobenzoxyderivates (0.05 Mol) werden in 0.5 l Methanol/Dimethylformamid (4:1) in üblicher Weise in Gegenwart von 2 g Palladiummohr hydriert. Nach beendeter Kohlendioxydentwicklung saugt man vom Katalysator ab, dampft das Filtrat unterhalb von 40° i. Vak. ein und kristallisiert den Rückstand aus ca. 0.1 l Wasser um. Das lufttrockene Peptid schmilzt bei 146°. Ausb. 14.0 g (81 % d. Th.), $R_F = 0.90 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.35$, $[\alpha]_D^{20}$: -8.5 ± 0.5° ($c = 1$, Methanol).

2. *Arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysynamid-trihydrochlorid (Vc)*: In die gemäß A. 2. bereitete Lösung des gemischten Anhydrids von 26.1 g II (40 mMol) gibt man unter Vibromischung in einem Guß die eiskalte Lösung von 13.8 g IIIc (40 mMol) in 50 ccm 90-proz. wäbr. Dimethylformamid. Das Kältebad wird entfernt und, sobald die Mischung auf Raumtemperatur gekommen ist, das Lösungsmittel unterhalb von 40° i. Vak. weitgehend abgezogen. Das beim Durchschütteln mit 1 l in $NaHCO_3$ ungelöst bleibende Harz hydriert man in 0.4 l 90-proz. Essigsäure in Gegenwart von 5 g Palladiummohr wie unter B. 1. beschrieben. Die Lösung wird dann im Rotationsverdampfer unterhalb von 30° auf ein Volumen von 100 ccm eingengt, mit 0.5 l Wasser verdünnt und lyophilisiert. Rohausb. 15.6 g, $R_F = 0.27/0.36/0.58$. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt in Ammoniumacetatpuffer (Elutionsgradient 0.04—0.30 m) an Carboxymethylcellulose (200 g) chromatographiert. Durch dreimaliges Lyophilisieren der dem Hauptprodukt entsprechenden Fraktion erhält man das Pentapeptidderivat als *Triacetat-trihydrat*. Ausb. 11.5 g (29 % d. Th.), $R_F = 0.58 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.16$. $[\alpha]_D^{20}$: -58.7 ± 2° ($c = 1$, Wasser).

$C_{33}H_{63}N_{13}O_7 \cdot 3 C_2H_4O_2 \cdot 3 H_2O$ (986.8) Ber. N 18.4 Essigsäure 18.2 Wasser 5.5
Gef. N 18.3 Essigsäure 18.4 Wasser 5.1

Zur Überführung in das Trihydrochlorid gibt man zu diesem Triacetat die 0.43fache Menge Triäthylamin-hydrochlorid (3.15 Val) und lyophilisiert dreimal mit je 0.2 l Wasser.

$C_{33}H_{63}N_{13}O_7 \cdot 3 HCl \cdot 2 H_2O$ (898.3) Ber. Wasser 4.0 Gef. Wasser 4.3

3. *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysynamid-trihydrochlorid (VIc)*: 11.05 g Ib (10 mMol) und 6.28 g Vc (7 mMol) werden analog B. 2. nach der Azidmethode kondensiert und das Reaktionsprodukt, wie dort beschrieben, katalytisch hydriert und an Carboxymethylcellulose chromatographiert. Ausb. 4.40 g chromatographisch reines Peptidderivat als *Triacetat-tetrahydrat* (32 % d. Th.), $R_F = 0.92 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.06$, $[\alpha]_D^{20}$: -67.5 ± 2° ($c = 1$, Wasser).

Quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl: 4.03 Lys, 1.90 Arg, 2.00 Val, 2.14 Pro, 1.00 Gly, 1.27 NH₃.

$C_{78}H_{142}N_{22}O_{19} \cdot 3 C_2H_4O_2 \cdot 4 H_2O$ (1944.0) Ber. N 15.8 Essigsäure 9.25 Wasser 3.7
Gef. N 15.7 Essigsäure 10.0 Wasser 3.5

Zur Verdrängung des Acetations durch Chlorion wird mit der 0.22fachen Menge Triäthylamin-hydrochlorid (3.15 Val) lyophilisiert.

D. Dodecapeptidderivat VI d

1. *Valyl-N^ε-BOC-lysyl-valin-tert.-butylester (III d)*: Die Lösung von 49.4 g VIII¹) (0.1 Mol) in 100 ccm Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur mit 500 ccm Eisessig verdünnt. In diese Mischung trägt man bei -10° unter Rühren kurz nacheinander 110 ccm 1 *m* wäbr. NaNO₂ und 200 ccm 1 *n* HCl ein, rührt noch 5 Min. bei -10° und verdünnt die Reaktionslösung dann mit 5 *l* Eiswasser. Vom harzig abgeschiedenen Azid wird dekantiert, dieses in eiskalter 1 *n* NaHCO₃ gut abgepreßt und dekantierend mit Eiswasser gewaschen. Das feuchte Azid und 20.6 g *Valin-tert.-butylester* (0.11 Mol) löst man unter Eiskühlung in 400 ccm Dimethylformamid und beläßt die Mischung 3 Tage im Kühlschrank. Anschließend wird das Dimethylformamid i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 150 ccm Methanol aufgenommen und die Lösung in 1 *l* Wasser eingerührt. Die pulverige Fällung wird auf der Nutsche gut mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Zur Reinigung löst man das Rohprodukt (51 g, Schmp. 140–142°) in warmem Essigester und fällt es mit dem dreifachen Volumen Petroläther wieder aus. Ausb. 31 g (49 % d. Th.), Schmp. 146–147°, $R_F = 0.96 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.83$, $[\alpha]_D^{20}$: $-37.2 \pm 0.5^{\circ}$ ($c = 1$, Methanol).

29 g dieses Carbobenzoxyderivates (0.045 Mol) werden in 130 ccm Methanol mittels Palladiummohrs in üblicher Weise katalytisch hydriert. Durch Eindampfen der Methanolösung, zuletzt bei 40°/0.1 Torr, erhält man die Base als farbloses Öl. Ausb. 23 g (quantitativ), $R_F = 0.93 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.37$.

2. *Arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysyl-valin-tert.-butylester-triacetat (Vd)*: In die gemäß A. 2. bereitete Lösung des gemischten Anhydrids von 26.1 g II (40 mMol) gibt man bei -10° unter Vibromischung die auf $+5^{\circ}$ abgekühlte Lösung von 21.1 g III d (42 mMol) in 50 ccm Dioxan. Nach dem Eindampfen der Reaktionslösung verteilt man den harzigen Rückstand zwischen 1 *l* Essigester und 0.5 *l* Wasser, wäscht die Essigesterlösung mit je 0.2 *l* 0.5 *m* Citronensäure, 1 *n* NaHCO₃ und Wasser, trocknet sie kurz über wasserfreiem Magnesiumsulfat und dampft ein. Das amorphe Rohprodukt (ca. 50 g, $R_F = 0.96$) wird in 1 *l* einer Methanol/Wasser/Eisessig-Mischung (10:2:1) in Gegenwart von Palladiummohr in üblicher Weise katalytisch hydriert (insgesamt 20 Stdn.). Nach Abtrennen des Katalysators neutralisiert man die Lösung mit konz. wäbr. Ammoniak und dampft ein. Den harzigen Rückstand löst man in 50 ccm warmem Methanol, fällt durch Zugabe von 100 ccm 5-proz. Essigsäure unvollständig hydrierte Nebenprodukte (ca. 6 g, $R_F = 0.97 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.83$) aus und reinigt das gelöste Peptid durch Chromatographie in Ammoniumacetatpuffer (Elutionsgradient 0.04–0.28 *m*) an einer Säule von 200 g Carboxymethylcellulose. Ausb. 12.9 g (28.5 % d. Th.), $R_F = 0.80 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.22$, $[\alpha]_D^{20}$: $-76.1 \pm 0.5^{\circ}$ ($c = 1$, Wasser).

C₄₂H₇₉N₁₃O₉ · 3 C₂H₄O₂ · 2 H₂O (1126.1) Ber. N 16.2 Essigsäure 16.0 Wasser 2.7
Gef. N 16.2 Essigsäure 16.5 Wasser 2.7

3. *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysyl-valin-tert.-butylester-trihydrochlorid (VI d)*: 11.05 g Ib (10 mMol) werden analog B. 2. in 90-proz. wäbr. Tetrahydrofuran in das Azid übergeführt und die Lösung bei -5° mit der vorgekühlten Mischung von 5.65 g Vd (5 mMol), 6.9 ccm Triäthylamin (5 mMol) und 50 ccm Dimethylformamid versetzt. Nach zweitägigem Aufbewahren bei 0° dampft man i. Vak. ein und hydriert den Rückstand in 0.5 *l* Methanol in üblicher Weise (ca. 3 g Palladiummohr) katalytisch bis zur beendeten Kohlendioxidentwicklung. Das rohe Hydrierungsprodukt (9.4 g, $R_F = 0.91 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.06/0.10/0.16$) nimmt man in 10 ccm Dimethylformamid auf, verdünnt mit 90 ccm 1-proz. Essigsäure und filtriert. Diese Lösung wird im Laufe von 200 Stdn. durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese (Elphor VaP von Fa. Bender & Hobein) aufgetrennt (Puffer: 50 g Ammoniumacetat/25 ccm Eisessig in 10 *l*

Wasser, Puffergeschwindigkeit 60 cm/Stde., Spannung 1300 Volt). Das gewünschte Peptid befindet sich in den Fraktionen 22–32 (insges. 48 Fraktionen, Fraktion I = Kathode). Sie werden vereinigt und dreimal lyophilisiert. Ausb. 3.75 g chromatographisch reines Peptid als *Triacetat-trihydrat* (36 % d. Th.), $R_F = 0.88 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.10$, $[\alpha]_D^{20}$: $-80.1 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

Quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl: 3.90 Lys, 1.91 Arg, 1.96 Pro, 1.00 Gly, 3.03 Val.

$C_{87}H_{158}N_{22}O_{21} \cdot 3 C_2H_4O_2 \cdot 3 H_2O$ (2082.3) Ber. N 14.8 Essigsäure 8.6 Wasser 2.6
Gef. N 14.9 Essigsäure 8.2 Wasser 2.8

Zur Überführung in das Trihydrochlorid wird das Triacetat mit der 0.205fachen Gewichtsmenge Triäthylamin-hydrochlorid (3.15 Val) lyophilisiert.

E. Tridecapeptidderivat VIe

1. *Valyl-tyrosinamid*: Die Suspension von 41.6 g fein gepulvertem *N-Carbobenzoxy-valyl-tyrosinamid*⁴⁾ (0.1 Mol) in 0.5 l Dimethylformamid/Äthanol (1:1) wird in Gegenwart von 4 g Palladiummohr in offener Apparatur hydriert, bis das Peptid in Lösung gegangen und die Kohlendioxydentwicklung beendet ist. Man engt die Lösung unterhalb von 50° i. Vak. auf ein Viertel ein und schüttelt das Konzentrat mit dem vierfachen Volumen trockenem Äther durch. Die pulverige Fällung wird abgesaugt, gut mit Äther gewaschen und luftgetrocknet. Ausb. 23.4 g (84 % d. Th.), Schmp. 200°, nach Umkristallisieren aus Dimethylformamid 208°. $R_F = 0.72$, $[\alpha]_D^{20}$: $+16.3 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Methanol). Die Base löst sich bei Raumtemperatur klar in 5-proz. Essigsäure.

$C_{14}H_{21}N_3O_3$ (279.3) Ber. N 15.1 Gef. N 15.2

2. *N-Carbobenzoxy-valyl-N^e-BOC-lysyl-valyl-tyrosinamid*: 49.4 g VIII (0.1 Mol) werden gemäß D. 1. in das Azid umgewandelt. Man löst das feuchte Produkt in 0.3 l eiskaltem Dimethylformamid und gibt dann die vorgekühlte Lösung von 28.0 g *Valyl-tyrosinamid* (0.1 Mol) in 0.2 l Dimethylformamid zu. Die Mischung, aus der sich bereits nach 10 Min. das Kupplungsprodukt gelartig abzuschneiden beginnt, läßt man noch 18 Stdn. bei +5° stehen, erwärmt sie dann auf dem Dampfbad bis zur klaren Lösung, gibt in der Wärme das gleiche Volumen Essigester zu und läßt 3 Stdn. bei Raumtemperatur kristallisieren. Das Gel wird scharf abgenutscht, mit 0.3 l Dimethylformamid/Essigester (1:2) gewaschen. Nach dem Verreiben mit 0.5 l 5-proz. Essigsäure wird erneut abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Getrocknet wird zunächst an der Luft und dann bei 50°/0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz. Ausb. 46 g (62 % d. Th.), Zers.-P. 236–237°, $R_F = 0.93 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.85$, $[\alpha]_D^{20}$: $-18.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{38}H_{58}N_6O_9$ (742.9) Ber. C 62.8 H 7.7 N 11.3 Gef. C 62.6 H 8.0 N 11.4

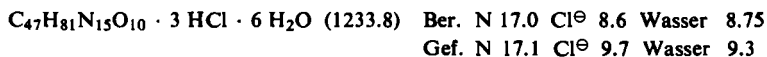
3. *Valyl-N^e-BOC-lysyl-valyl-tyrosinamid (IIIe)*: Man suspendiert 14.9 g des Carbobenzoxyderivates aus E. 2. (20 mMol) in 150 ccm Dimethylformamid und hydriert katalytisch in offener Apparatur in Gegenwart von 2 g Palladiummohr, bis das Peptid in Lösung gegangen und die Kohlendioxydentwicklung beendet ist. Nach Abtrennen des Katalysators engt man die Lösung auf die Hälfte ein und schüttelt sie mit 0.4 l Äther durch. Die amorphe, pulverige Fällung wird auf der Nutsche gut mit Äther gewaschen und luftgetrocknet. Ausb. 12.0 g (fast quantitativ), Zers.-P. 248–250°, $R_F = 0.88 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.57$, $[\alpha]_D^{20}$: $-31.6 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, 5-proz. Essigsäure) und $22.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{30}H_{52}N_6O_7$ (608.8) Ber. C 59.1 H 8.6 N 13.8 Gef. C 59.0 H 9.0 N 13.7

⁴⁾ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 [1948].

4. *N^α-Carbobenzoxy-N^ω-nitroarginyl-N^ω-nitroarginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysyl-valyl-tyrosinamid (IVe)*: 26.1 g *II* (40 mMol) werden gemäß A. 2. in das gemischte Anhydrid übergeführt. In die Reaktionslösung gibt man bei -10° die eiskalte Lösung von 24.3 g *IIIe* (40 mMol) in 250 ccm 95-proz. wäbr. Dimethylformamid und läßt die Mischung innerhalb 1 Stde. auf Raumtemperatur kommen. Nach Stehenlassen über Nacht verreibt man das gebildete Gel mit 2 / 0.5 *n* NaHCO₃, zentrifugiert und wäscht auf der Zentrifuge mit Wasser. Das feuchte Produkt wird in gleicher Weise mit 1 / 5-proz. Essigsäure behandelt und dann bei 50°/15 Torr über KOH bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 31 g (63 % d. Th.), Zers.-P. 213–215°, $R_F = 0.94 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.86$, $[\alpha]_D^{20}$: $-28.0 \pm 0.5^{\circ}$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

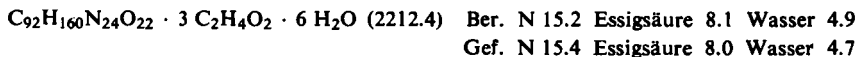
5. *Arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysyl-valyl-tyrosinamid-trihydrochlorid (Ve)*: 12.4 g *IVe* (10 mMol) werden in 0.5 / 90-proz. wäbr. Essigsäure in Gegenwart von 3 g Palladiummohr 6 Stdn. in offener Apparatur (Durchleiten von H₂ unter Vibromischung) und nach Zugabe von 3 g frischem Katalysator noch 18 Stdn. in der Schüttelente hydriert. Die Lösung wird dann bei einer Badtemperatur von 40–45° i. Vak. auf 50 ccm eingeeengt, mit 0.5 l Wasser verdünnt, filtriert und lyophilisiert. Das Rohprodukt (10.5 g, $R_F = 0.70/0.84 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.38/0.50$) wird in Ammoniumacetatpuffer (Elutionsgradient 0.04–0.40 *m*) an Carboxymethylcellulose (100 g) chromatographiert. Das insgesamt dreimal lyophilisierte Hauptprodukt (ca. 0.15–0.25 *ml* Eluat) wird zuletzt in 0.4 l Wasser gelöst, die Lösung bei 0° mit 2 *n* HCl auf pH 2.2 eingestellt und lyophilisiert. Ausb. 7.7 g *Trihydrochlorid-hexahydrat* (62 % d. Th.), $R_F = 0.70 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.38$, $[\alpha]_D^{20}$: $-68.0 \pm 1^{\circ}$ ($c = 1$, Wasser).



6. *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N^ε-BOC-lysyl-valyl-tyrosinamid-trihydrochlorid (VIe)*: 22.1 g *Ib* (20 mMol) werden gemäß B. 2. in 90-proz. wäbr. Tetrahydrofuran in das Azid übergeführt und die Lösung bei 0° mit der eiskalten Mischung von 12.4 g *Ve* (10 mMol), 200 ccm Dimethylformamid und 1.80 ccm Triäthylamin (13 mMol) versetzt. Nach zweitägigem Stehenlassen bei +5° wird eingedampft und der Rückstand in 1.5 l Methanol in Gegenwart von 3 g Palladiummohr bis zur beendeten Kohlendioxidentwicklung hydriert. Man engt die Methanollösung auf ein kleines Volumen (ca. 50 ccm) ein, verdünnt das Konzentrat mit 100 ccm 2-proz. Essigsäure und trennt von harzig abgeschiedenen Nebenprodukten (überschüssige Hexapeptid-Kupplungskomponente) ab. Das durch Lyophilisieren isolierte Rohprodukt gibt man auf eine Säule von 300 g Carboxymethylcellulose und eluiert mit einem Ammoniumacetatpuffer steigender Molarität (0.02–0.22 *m*). Ausb. an chromatographisch reinem *Triacetat-hexahydrat* (dreimal lyophilisiert) 7.95 g (36 % d. Th.), $R_F = 0.96 \xrightarrow{\text{TFE}} 0.12$, $[\alpha]_D^{20}$: $-77.1 \pm 0.5^{\circ}$ ($c = 1$, 1-proz. Essigsäure).

Quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl:

4.00 Lys, 1.83 Arg, 2.15 Pro, 3.14 Val, 1.04 Gly, 0.88 Tyr.



Zur Umwandlung in das Trihydrochlorid löst man das Triacetat in 0.4 l Wasser, versetzt die Lösung mit 3.15 Val Triäthylamin-hydrochlorid (19 % des Peptidgewichtes) oder stellt sie mit 2 *n* HCl bei 0° auf pH 2.2 ein und lyophilisiert zweimal.