

Erich Wünsch und Gerhard Wendlberger

Zur Synthese des Glucagons, XI¹⁾

Darstellung der Sequenz 16–23

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 4. Mai 1966)

Die Synthese von *O*-tert.-Butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester, einer carboxylgeschützten Teilsequenz 16–23 des Glucagons, wird beschrieben.

Der Aufbau von Teilstücken des Peptidhormons mit der Arginyl-Arginyl-Sequenz unter Verwendung von *N*^ω-Nitro-arginin konnte im hiesigen Laboratorium bis zum *N*^α-Benzyloxycarbonyl-octa-peptid-[12-19]-benzylester mit besten Ergebnissen vorangetrieben werden²⁾. Die hydrogenolytische Entfernung von Amino-, Carboxyl- und Guanidino-Maskierungen gelang leider nur in Gramm-Ansätzen befriedigend; eine alkalische Verseifung der Estergruppierung war von Nebenreaktionen an der Asparagyl- β -tert.-butylester-Bindung begleitet. Der Aufbau anderer höherer Sequenzbereiche unter Benützung von H-Ser(BZL)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Ala-OBZL scheiterte alsbald aufgrund zu geringer Löslichkeiten.

Wir haben daher versucht, ein Octapeptid-Derivat der Glucagonsequenz 16–23 mit „guanidino-protonen-maskierten“ Arginylresten zu synthetisieren, erstens um die unerfreuliche Nitro-guanidino-Blockierung zu vermeiden, zweitens in der Hoffnung, hierbei weniger ungünstige Löslichkeitsprobleme vorzufinden.

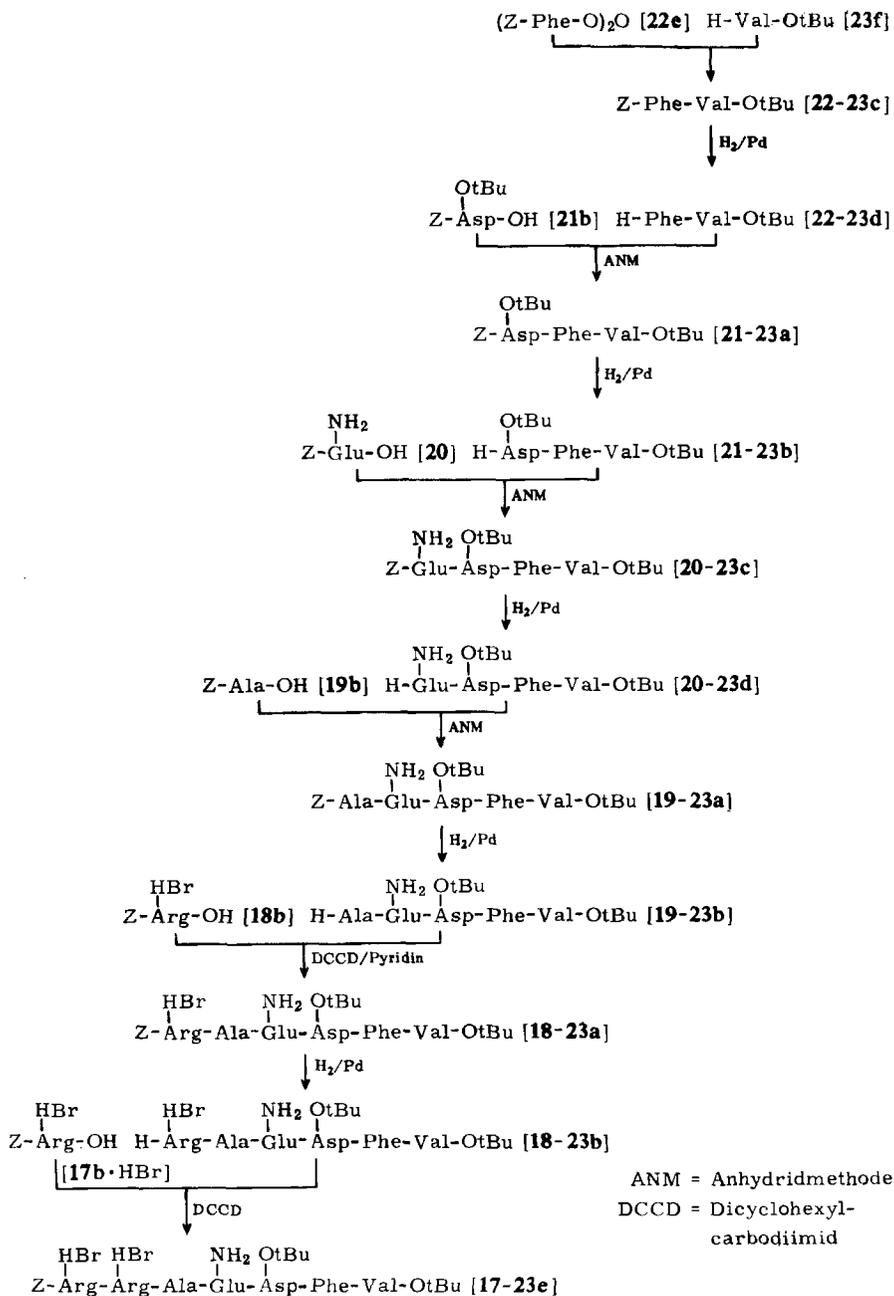
Die Darstellung des Pentapeptidesters H-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [19-23b] durch „stufenweisen“ Aufbau mittels der Benzyloxycarbonyl-aminosäuren bzw. Valin-tert.-butylester [23f] nach dem Verfahren symm. und gemischter Anhydride gelang glatt und ohne Schwierigkeiten (s. Schema 1). Für den Anbau von Benzyloxycarbonyl-arginin zum Benzyloxycarbonyl-hexapeptidester [18-23a] haben wir auf die Erfahrungen von Boissonnas³⁾ zurückgegriffen, nach denen die genannte Komponente mit Aminosäureester-hydrohalogeniden in Pyridin nach der Carbodiimid-Methode vereinigt werden kann. Ausgezeichnete Ergebnisse konnten erzielt werden, als wir Benzyloxycarbonyl-arginin-hydrobromid [18b] und freien Pentapeptidester [19-23b] als Startmaterialien benützten: Beide Verbindungen lösen sich rasch in

¹⁾ X. Mitteil.: E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966).

²⁾ E. Wünsch, Acta chim. Acad. Sci. hung. 44, 173 (1965).

³⁾ R. A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud, Ed. Sandrin und J.-P. Waller, Helv. chim. Acta 49, 123 (1961).

Schema 1



Pyridin (sehr wahrscheinlich unter Bildung eines „Doppel-Salzes“) und reagieren unter Einwirkung des Sheehan-Reagenzes zum Benzyloxycarbonyl-hexapeptidester-hydro-

bromid [18-23a]. Nach Digerieren des Rohprodukts mit Diäthyläther bzw. Umfällen aus Methanol/Essigester (sowohl Benzyloxycarbonyl-arginin-hydrobromid [18b] als auch die Aminokomponente [19-23b] sind in diesem Gemisch gut löslich) wurde Z-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [18-23a] in 91-proz. Ausbeute chromatographisch und analytisch rein isoliert. Die folgende hydrogenolytische Entacylierung erbrachte H-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu·AcOH [18-23b-Acetat] in fast quantitativer Ausbeute (s. Schema 1).

Ein erneuter Anbau von Benzyloxycarbonyl-arginin-hydrobromid [17b-Hydrobromid] zum Heptapeptid-Derivat [17-23e] (die Aminokomponente wurde für diese Umsetzung zunächst in das Dihydrobromid übergeführt und dann in Pyridin mit 1 Äquiv. Triäthylamin behandelt) verlief vom Blickpunkt der Verknüpfung aus ebenso günstig wie vorher; die Trennung von Z-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [17-23e] von nicht umgesetzten Ausgangsmaterialien [17b-Hydrobromid] und [18-23b] war aufgrund der sehr ähnlichen Löslichkeiten der Verbindungen schwierig und verlustreich.

Im Hinblick auf die angestrebte Synthese der Sequenz 16—23 haben wir den weiteren Aufbau auf folgenden drei Wegen (A—C) geplant:

1. (Weg A): Darstellung von PHT-Ser(tBu)-Arg-NHNH₂ [16-17b] und dessen Azid-Verknüpfung mit dem Hexapeptidester [18-23b] zum geschützten Octapeptid-Derivat.

BOC-Arg(NO₂)-OH [17] lieferte nach dem *Wieland-Boissonnas-Vaughan*-Verfahren in hoher Ausbeute BOC-Arg(NO₂)-NHNH-Z [17e], das mittels Trifluoressigsäure-Solvolyse zum H-Arg(NO₂)-NHNH-Z [17f] entacyliert wurde (94%, isoliert als Hydrochlorid). Die Vereinigung von PHT-Ser(tBu)-OH [16d] mit H-Arg(NO₂)-NHNH-Z [17f] mittels der Alkylkohlen säureanhydrid-Methode zu PHT-Ser(tBu)-Arg(NO₂)-NHNH-Z [16-17a] gelang ebenfalls (s. Versuchsteil 21.—23. und Schema 2); die folgende hydrogenolytische Entfernung der Guanidino- und Hydrazid-Maskierungen schlug jedoch fehl und damit scheiterte die Darstellung von PHT-Ser(tBu)-Arg-NHNH₂ [16-17b].

2. (Weg B): Stufenweiser Anbau von Z-Orn(PHT)-OH bzw. Z-Ser(tBu)-OH an den Hexapeptidester [18-23b] zum geschützten Octapeptid-Derivat, Abspaltung der N^δ-Phthaloyl-Schutzgruppe am Ornithin, Amidinierung (Guanylierung) der freien δ-Aminozur Guanidino-Gruppe und damit Darstellung des geschützten Octapeptid-Derivats Z-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23a].

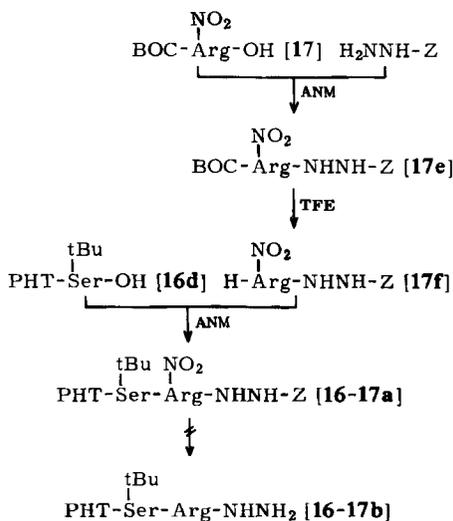
Unter Verwendung des erstmals von *Bodanszky* und Mitarbb.⁴⁾ beschriebenen Z-Orn(PHT)-ONP [17g] wurde der Acyl-heptapeptid-ester [17-23c] in ca. 95-proz. Ausbeute erhalten; die Abspaltung des Benzyloxycarbonyl-Restes gelang auf üblichem Wege und führte zum freien Heptapeptidester [17-23d] bzw. dessen Acetat. Die Anknüpfung von Z-Ser(tBu)-OH (als [16b]) verlief nach dem Nitrophenylester-Verfahren gleichfalls erfolgreich. Interessant war hierbei die Tatsache, daß Z-Ser(tBu)-Orn(PHT)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23c] beim aufeinanderfolgenden Behandeln mit sehr verdünnter Ammoniak- und Citronensäure-Lösung (im Zuge der Reinigungsoperationen) in eine Guanidino-Citrat-Form übergeführt wurde, wobei auf 3 Mol Octapeptid-Derivat 1 Mol Citronensäure als Salz-

⁴⁾ *M. Bodanszky, M. A. Ondetti, C. A. Birkhimer und P. L. Thomas, J. Amer. chem. Soc. 86, 4452 (1964).*

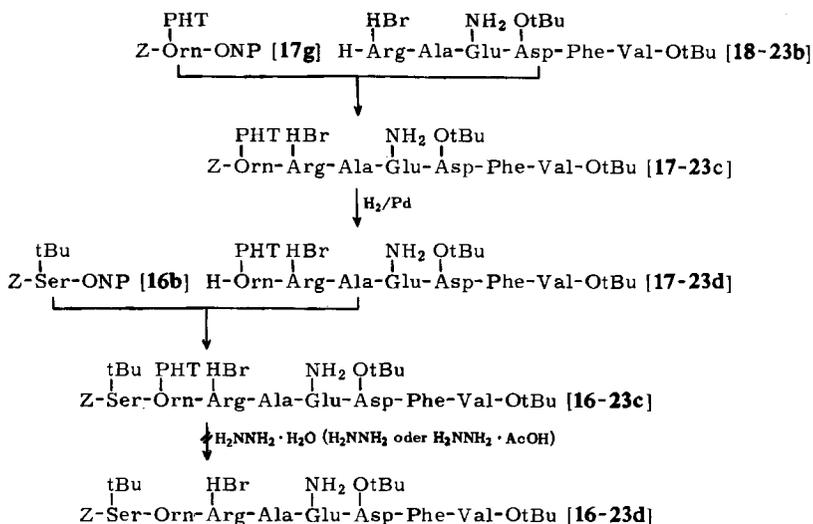
bildner auftrat. Das Peptid-Citrat [16-23c-Citrat] konnte durch Titration mit Bromwasserstoffsäure und Ätherextraktion der freien Citronensäure ohne Verluste in das geschützte Octapeptid-hydrobromid [16-23c] übergeführt werden (s. Versuchsteil 18.-20b. und Schema 2).

Schema 2

Weg A



Weg B



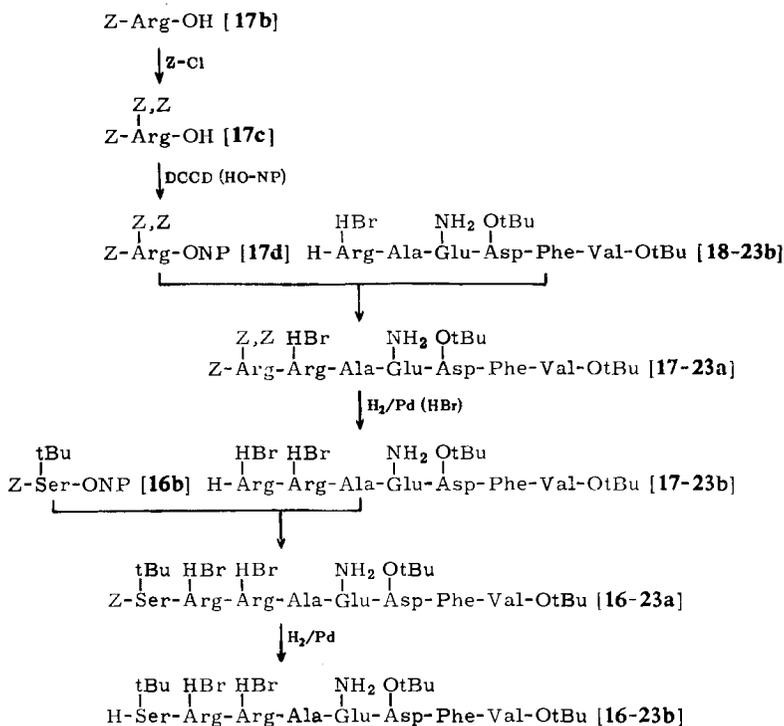
Diese Deprotonierung der Guanidinofunktion geht auch bei der Chromatographie des geschützten Octapeptid-Derivats in schwach basischen Lösungsmittelsystemen vor sich. Bevorzugt man eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel, so wird teilweise an der Guanidinogruppe freies Octapeptid-Derivat an Kieselsäure gebunden; als Folge treten zwei Sakaguchi-positive Flecken auf.

Versuche der Entphthaloylierung am Octapeptid-Derivat [16-23c] u. a. auch mittels Hydrazin-acetat nach *Schwyzler*⁵⁾ schlugen fehl; im chromatographischen Test traten stets zwei Produkte auf, die wir auf präparativem Wege nicht trennen konnten.

3. (Weg C): Stufenweiser Anbau von Tris-benzyloxycarbonyl-arginin und Z-Ser(tBu)-OH an den Hexapeptidester [18-23b] zu Z-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23a]. Das als Ausgangsmaterial benötigte Tris-benzyloxycarbonyl-arginin war von *Zervas* und Mitarbb.⁶⁾ durch Peracylierung von Arginin in ca. 15-proz. Ausbeute beschrieben worden. Die Reproduktion des Verfahrens gelang uns jedoch nur in weit geringerer Ausbeute an reinem, isomerenfreiem *N*^α.*N*^δ.*N*^ω-Tris-benzyloxycarbonyl-arginin. Erfolgreich war dagegen die Guanidino-Diacylierung von Z-Arg-OH in Analogie zu der von *Weygand* und

Schema 3

Weg C



⁵⁾ R. Schwyzler, A. Costopanogiotis und P. Sieber, *Chimia* [Aarau, Schweiz] **16**, 295 (1962).

⁶⁾ L. Zervas, T. Otani, M. Winitz und J. P. Greenstein, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2878 (1959); L. Zervas, M. Winitz und J. P. Greenstein, *J. org. Chemistry* **22**, 1515 (1957).

Nintz⁷⁾ beschriebenen Darstellungstechnik von N^α -[4-Methoxy-benzyloxycarbonyl]- N^δ . N^ω -bis-benzyloxycarbonyl-arginin. Isomeren-freies N^α . N^δ . N^ω -Tris-benzyloxycarbonyl-arginin [17e] konnte in 32-proz. Ausbeute kristallisiert gewonnen werden; der daraus wie üblich zugängliche 4-Nitro-phenylester [17d] zeichnete sich durch einen gegenüber den Literaturwerten⁸⁾ höheren Schmelzpunkt aus.

Die Verknüpfung von Z-Arg(δ . ω -Z.Z)-ONP [17d] mit dem Hexapeptidester [18-23b] zu Z-Arg(δ . ω -Z.Z)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [17-23a] bereitete keine Schwierigkeiten; die Unlöslichkeit dieses Peptid-Derivats in Essigester bzw. Wasser erlaubte eine einwandfreie Abtrennung nicht umgesetzter Startmaterialien [17d] und [18-23b] und damit eine bequeme Reindarstellung.

Anschließende hydrogenolytische Entacylierung und Umsetzung des fast quantitativ erhaltenen H-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [17-23b] (isoliert als Acetat) mit Z-Ser(tBu)-ONP [16b] erbrachte den Benzyloxycarbonyloctapeptid-ester [16-23a] in über 90-proz. Ausbeute. Nach erneuter Abspaltung der α -Aminoschutzgruppe mittels katalytisch erregtem Wasserstoff erhielten wir schließlich den gewünschten Octapeptidester H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [16-23b] in ausgezeichnete Reinheit (s. Versuchsteil 12. – 17. und Schema 3).

Die Gesamt-Synthese dieser Sequenz 16 – 23 war auch im „100-Gramm-Bereich“ mit gleich gutem Erfolg durchführbar; die Löslicheitseigenschaften des Octapeptid-Derivats [16-23b] schienen für die weiteren Umsetzungen sehr erfolgversprechend (s. dazu die folgende XII. Mitteilung).

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützungen dieser und der folgenden Arbeiten erneut zu höchstem Dank verpflichtet.

Unserer technischen Assistentin Frau *U. Strobel* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit, Fräulein *R. Scharf* für die Ausführung der Aminosäure-Analysen, Herrn *W. Beck* (Leiter des mikroanalytischen Laboratoriums der Abteilung) für die Elementaranalysen.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt, die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter Firma Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

Ausgangsamino-säuren (Chem. Fabrik Fluka AG): spezif. Drehung $100 \pm 2\%$, Fremdaminosäuren unter 0.05% (nach *Stein* und *Moore*).

1. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanin-anhydrid* [22e]⁹⁾: 59.8 g *Z-Phe-OH* [22d] in 300 ccm Acetonitril werden bei -5° mit 20.6 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt; das Reaktionsgemisch wird 30 Min. bei -5° , anschließend 12 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand aus absol. Benzol oder Acetonitril umkristallisiert: Schmp. $139-140^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $+19.7 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+23.2^\circ$ ($c = 1$; in Methylenchlorid). Ausb. 23 g (40%).

⁷⁾ *F. Weygand* und *E. Nintz*, *Z. Naturforsch.* **20b**, 429 (1965).

⁸⁾ *E. D. Nicolaidis*, *H. A. De Wald*, *P. G. Shorley* und *H. O. J. Collier*, *Nature* [London] **187**, 773 (1960).

⁹⁾ *G. Tadema*, *E. Harryvan*, *H. J. Panneman* und *J. F. Arens*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **79**, 688 (1960).

2. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester* [22-23c]: 81.0 g (*Z-Phe-O*)₂O [22e] in 400 ccm Acetonitril werden bei -15° mit einer Lösung von 19.2 g *H-Val-OtBu-HCl* [23f-Hydrochlorid]¹⁰⁾ und 19.5 ccm *Triäthylamin* in 400 ccm Acetonitril (vorgekühlt auf -15°) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bei -10° gerührt. Der nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhaltene Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die ätherische Lösung des verbleibenden Öls wird vorsichtig mit Petroläther versetzt; nach längerem Belassen im Kühlschrank scheiden sich farblose Kristalle ab: Schmp. $104-106^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-19.85 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -23.53° ($c = 1.5$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:30:35) bzw. n-Butanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2). Ausb. 52.7 g (83%).

$C_{26}H_{34}N_2O_5$ (454.6) Ber. C 68.70 H 7.54 N 6.16 Gef. C 68.66 H 7.44 N 6.16

3. *L-Phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester* [22-23d]: 45.4 g *Z-Phe-Val-OtBu* [22-23c] in 500 ccm Propanol-(2) werden nach Zusatz von 6 ccm Essigsäure und in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird mit einem Gemisch von 95 ccm *n* NaOH und 100 ccm 10-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung behandelt, die abgetrennte Essigesterphase mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus der ätherischen Lösung des verbleibenden Öls kristallisiert der freie *Dipeptidester* auf Zusatz von Petroläther in Nadeln: Schmp. $66-67^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-29.55 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -35.47° ($c = 1.5$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:30:35) bzw. in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2). Ausb. 30.4 g (95%).

$C_{18}H_{28}N_2O_3$ (320.4) Ber. C 67.47 H 8.81 N 8.74 Gef. C 67.43 H 8.78 N 8.55

4. *Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester* [21-23a]: 32.3 g *Z-Asp(OtBu)-OH* [21b]¹¹⁾ und 14 ccm *Triäthylamin* in 150 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei -15° mit 9.54 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* wie üblich umgesetzt. Nach 10 Min. läßt man zu der Lösung des gemischten Anhydrids bei -15° und unter Rühren 32 g *H-Phe-Val-OtBu* [22-23d] in 200 ccm absol. Tetrahydrofuran rasch zufließen. Nach 3stdg. Rühren bei -15° wird das Reaktionsgemisch 10 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt, das Filtrat vom abgeschiedenen Triäthylammoniumchlorid i. Vak. eingedampft, das erhaltene Öl zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase wie üblich mit Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Aus der Lösung des Rückstands in Diäthyläther scheiden sich alsbald farblose Nadeln ab: Schmp. $121-122^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: -37.75 \bullet 1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -44.3° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2). Ausb. 53.3 g (85%).

$C_{34}H_{47}N_3O_8$ (625.8) Ber. C 65.26 H 7.57 N 6.71 Gef. C 65.39 H 7.34 N 7.02

5. *L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester* [21-23b]: 87.6 g *Z-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [21-23a] in 750 ccm Methanol werden nach Zusatz von 20 ccm Eisessig in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert. Das Filtrat liefert nach Eindampfen i. Vak. einen öligen Rückstand; dessen Lösung in Essigester wird mit überschüss. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung behandelt, die abgetrennte organische Phase mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Diäthyläther/Petroläther: Schmp. $98-100^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-11.8 \pm 1^{\circ}$ bzw.

¹⁰⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 (1960).

¹¹⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **328**, 235 (1962).

$[\alpha]_{546}^{20}$: -14.5° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. in n-Heptan/n-Butanol/Eisessig (3:2:1). Ausb. 68 g (97%).

$C_{26}H_{41}N_3O_6$ (491.6) Ber. C 63.52 H 8.41 N 8.55 Gef. C 63.51 H 8.49 N 8.71

6. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert.*-*butylester*)-*L-phenylalanyl-L-valin-tert.*-*butylester* [20-23c]: Die Lösung von 37.5 g *Z-Glu(NH₂)-OH* [20]¹² in 750 ccm absol. Tetrahydrofuran wird auf -15° abgekühlt und mit 18.75 ccm *Triäthylamin* und darauf mit 12.81 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* unter Rühren versetzt. Nach 15 Min. läßt man zur Lösung des gemischten Anhydrids 65.7 g *H-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [21-23b] in 400 ccm Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (2:1) unter Rühren einfließen. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stdn. bei -14° und 10 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat vom ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorid wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand aus viel absol. Äthanol umkristallisiert: Schmp. 208–209°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-36.5 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -43.95° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:30:35). Ausb. 90 g (90%).

$C_{39}H_{55}N_5O_{10}$ (753.9) Ber. C 62.13 H 7.39 N 9.29 Gef. C 62.31 H 7.50 N 9.64

7. *L-Glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert.*-*butylester*)-*L-phenylalanyl-L-valin-tert.*-*butylester-hydrochlorid* [20-23d-Hydrochlorid]: 89.1 g *Z-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [20-23c], suspendiert in 1500 ccm absol. Methanol, werden in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert, während man unter Zutropfen von 240 ccm 0.5 *n* methanol. HCl in der Reaktionslösung pH 4.5–5.5 einhält. Nach erfolgter Auflösung des Produkts (ca. 5–6 Stdn.) und beendeter Kohlendioxidentwicklung wird auf pH 3.8 eingestellt und das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingedampft: Amorpher Rückstand mit $[\alpha]_{546}^{20}$: $-13.1 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -16.3° ($c = 1.5$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 75 g (97%).

$C_{31}H_{50}N_5O_8$ Cl (656.2) Ber. C 56.74 H 7.68 N 10.76 Gef. C 56.74 H 7.98 N 10.76

8. *Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert.*-*butylester*)-*L-phenylalanyl-L-valin-tert.*-*butylester* [19-23a]: Zu 35.7 g *Z-Ala-OH* [19b]¹³ in 1000 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei -15° 22.4 ccm *Triäthylamin* gegeben und anschließend unter Rühren 20.3 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* zutropft. Nach 10 Min. läßt man zu dem Reaktionsansatz eine auf -15° vorgekühlte Lösung von 91.84 g *H-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu-HCl* [20-23d-HCl] und 22.4 ccm *Triäthylamin* in 1000 ccm Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (1:1) langsam zufließen; man rührt die Mischung 3 Stdn. bei -15° bis -10° und anschließend 12 Stdn. bei Raumtemp. Das Filtrat vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand aus Äthanol/Wasser umkristallisiert: Schmp. 206–208°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-38.9 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -46.7° ($c = 1$; in 80-proz. Essigsäure). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 125.3 g (92%).

$C_{42}H_{60}N_6O_{11}$ (825.0) Ber. C 61.15 H 7.33 N 10.20 Gef. C 61.11 H 7.45 N 10.38

9. *L-Alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert.*-*butylester*)-*L-phenylalanyl-L-valin-tert.*-*butyl-ester* [19-23b]

a) 123.6 g *Z-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [19-23a] in 3000 ccm Methanol (Suspension) werden in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert, wobei allmählich Lösung erfolgt. Durch Zutropfen von 0.5 *n* methanol. HCl wird gleichzeitig pH 5–6 eingehalten (Verbrauch 100 ccm). Das Filtrat wird i. Vak. bei 20° Badtemp. eingedampft, der feste Rück-

¹²⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 2497 (1964).

¹³⁾ M. Bergmann und L. Zervas, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1192 (1932).

stand mit Äther verrieben. Nach Abfiltrieren und Trocknen i. Vak. farbloses Pulver: Schmp. 203–204°; $[\alpha]_D^{20}$: $-36.0 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -43.3° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 108.9 g (quantitativ).

b) 108.9 g des nach a) erhaltenen *Pentapeptid-tert.-butylester-hydrochlorids* [19-23 b-Hydrochlorid] in 2000 ccm Wasser werden bei 0° unter Rühren tropfenweise mit 23.1 ccm *Triäthylamin* versetzt. Nach 1 stdg. Rühren bei Raumtemp. wird die Mischung wieder auf 0° abgekühlt, vom ausgefallenen Produkt abfiltriert und dieses mit Wasser gut gewaschen. Das luftgetrocknete Material wird mit Äther fein verrieben, auf die Nutsche gebracht, mit Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet: amorphes farbloses Pulver vom Schmp. 210–211°; $[\alpha]_D^{20}$: $-39.4 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -47.4° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 94.65 g (91.5 %).

$C_{34}H_{54}N_6O_9$ (690.9) Ber. C 59.10 H 7.88 N 12.17 Gef. C 58.98 H 7.99 N 12.19

10. *Benzoyloxycarbonyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester* [18-23 a]: 12.5 g *H-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [19-23 b] und 7.78 g *Z-Arg(HBr)-OH* [18b]¹⁴⁾ in 100 ccm Pyridin werden bei -10° mit 4.12 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend 6 Stdn. bei -5° und weitere 48 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Man kühlt auf -10° ab, filtriert vom ausgefallenen Harnstoff ab und dampft die Lösung schließlich i. Vak. vollständig ein. Der im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknete Rückstand wird dreimal mit absol. Äther digeriert und anschließend zweimal aus Methanol/Essigester umgefällt: Schmp. 196.5–197°; $[\alpha]_D^{20}$: $-38.1 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -46.0° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2). Ausb. 17.6 g (91 %).

(Ein Ansatz mit der siebenfachen Menge der Ausgangsmaterialien verlief mit gleich gutem Erfolg.)

$C_{48}H_{73}N_{10}O_{12}Br$ (1062.1) Ber. C 54.29 H 6.93 N 13.20 Gef. C 54.05 H 6.99 N 13.23

11. *L-Arginyll(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester-acetat* [18-23 b-Acetat]: 19.8 g *Z-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [18-23 a] in 200 ccm Methanol werden in Gegenwart von 1.1 ccm Eisessig und Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in wenig heißem Methanol aufgenommen und in viel absol. Äther eingerührt. Der flockige Niederschlag wird abfiltriert und i. Vak. bei 50–60° über Kaliumhydroxid und P_2O_5 getrocknet (das Lösungsmittelfeuchte Produkt ist sehr hygroskopisch): Schmp. 173–175°; $[\alpha]_D^{20}$: $-32.4 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -39.5° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 17.4 g (94 %).

(Eine hydrogenolytische Entfernung der Benzoyloxycarbonyl-Schutzgruppe bei 118.8 g Ausgangsmaterial verlief mit gleich gutem Erfolg.)

$C_{42}H_{71}N_{10}O_{12}Br$ (988.0) Ber. C 51.06 H 7.24 N 14.18 Gef. C 51.12 H 7.20 N 14.34

12. *N^α.N^β.N^ω-Tris-benzoyloxycarbonyl-L-arginin* [17c]: 43.5 g *Z-Arg-OH* [17b]¹⁴⁾ in 280 ccm 2*n* NaOH und 100 ccm Dioxan werden bei 0° unter kräftigem Rühren mit 98 ccm *Chlorameisensäure-benzylester* und 353 ccm 2*n* NaOH zwischen 0 und 3° innerhalb 1 Stde. umgesetzt. (Die Zugabe von Acylchlorid und Lauge erfolgt abwechselnd in etwa 10 Portionen.) Nach 1 stdg. Nachrühren bei 0–3° filtriert man das ausgefallene Tris-benzoyloxycarbonyl-arginin-Natriumsalz ab und wäscht dieses mit 300 ccm eiskalter 5-proz. Natriumcarbonat-Lösung. Das trocken-gesaugte Produkt wird mit Äther verrieben, erneut auf das Filter gebracht und mit Äther ge-

¹⁴⁾ R. A. Boissonnas, St. Guttman, R. L. Huguenin, P. A. Jaquenoud und Ed. Sandrin, Helv. chim. Acta 41, 1867 (1958).

waschen. Anschließend wird das trockene Natriumsalz in absol. Äthanol aufgenommen (evtl. wird vom unlöslichen Material abfiltriert); aus der erhaltenen Lösung scheidet sich im Kühlschränk ein Niederschlag ab, der abfiltriert und i. Vak. getrocknet wird. Die Suspension des erhaltenen Natriumsalzes (63 g) in 1500 ccm Essigester wird unter Rühren mit 350 ccm 2-proz. eiskalter Schwefelsäure versetzt. Sobald Lösung erfolgt ist, wird die Essigesterphase abgetrennt, diese mit 2-proz. Schwefelsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der feste Rückstand wird mehrfach mit Petroläther digeriert und anschließend zweimal aus Essigester umkristallisiert: Schmp. 137–138°; $[\alpha]_D^{20}$: $+16.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+19.4^\circ$ ($c = 1$; in Chlf.)¹⁵. Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 25.5 g (32%).

$C_{30}H_{32}N_4O_8$ (576.6) Ber. C 62.50 H 5.60 N 9.72 Gef. C 62.27 H 5.80 N 9.97

13. $N^{\alpha}.N^{\beta}.N^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginin-[4-nitro-phenylester] [17d]: 57.6 g Tris-benzyloxycarbonyl-arginin [17c] und 15.3 g 4-Nitro-phenol löst man in möglichst wenig Essigester in der Wärme, kühlt die Mischung auf -10° ab und versetzt anschließend mit 22.6 g Dicyclohexylcarbodiimid. Das Reaktionsgemisch wird 10 Stdn. bei 0° und 8 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, auf -10° abgekühlt und vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff durch Filtration befreit. Die erhaltene Lösung wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der feste Rückstand mit viel absol. Äthanol ausgekocht und schließlich aus Essigester/Äthanol umkristallisiert. Nach erneuter Heißextraktion mit absol. Äthanol und Trocknen i. Vak. Schmp. 134–135°; $[\alpha]_D^{20}$: $-7.25 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -9.41° ($c = 1$; in Chlf.)¹⁶. Chromatogr. rein in n-Heptan/tert-Butylalkohol/Pyridin (3:1:1). Ausb. 60 g (84%).

$C_{36}H_{35}N_5O_{10}$ (715.7) Ber. C 61.97 H 5.06 N 10.04 Gef. C 61.86 H 5.05 N 10.28

14. $N^{\alpha}.N^{\beta}.N^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [17-23a]: 9.9 g H-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu·AcOH [18-23b-Acetat] in 150 ccm Dimethylformamid werden bei 0° mit 8 g Tris-benzyloxycarbonyl-arginin-nitrophenylester [17d] versetzt; nach 10stdg. Rühren bei 0° und 40 Stdn. bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der feste gelbe Rückstand mit Äther verrieben, abfiltriert und mit Äther gewaschen. Das staubtrockene Produkt wird mit ca. 500 ccm Essigester unter Rühren 15 Min. ausgekocht, abfiltriert, mit Essigester gewaschen und getrocknet. Nach anschließendem Digerieren mit Wasser nimmt man das erhaltene Material in wenig Dimethylformamid/Methanol auf; die Lösung wird 10 Min. unter Rühren mit Aktivkohle auf 50° erwärmt, filtriert und mit Äther versetzt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und bei 80° i. Vak. getrocknet: Schmp. 189–190°; $[\alpha]_D^{20}$: $-26.9 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.35° ($c = 1$; in 80-proz. Essigsäure). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 14.2 g (95.5%).

(Eine Verknüpfung der beiden Komponenten in zehnfacher Menge gelingt mit 95–96-proz. Ausbeute.)

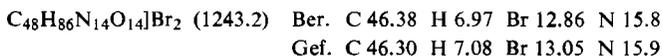
$C_{70}H_{97}N_{14}O_{17}Br$ (1486.6) Ber. C 56.56 H 6.58 Br 5.38 N 13.20
Gef. C 56.47 H 6.69 Br 5.28 N 13.02

15. L-Arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester-acetat [17-23b-Acetat]: 10.65 g Z-Arg(δ,ω -Z,Z)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [17-23a] in 400 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz und 20 ccm Eisessig wie üblich hydriert (ca. 15 Stdn.). Das Filtrat wird mit n HBr auf pH 5.2 gestellt (Verbrauch ca. 7.1 ccm) und

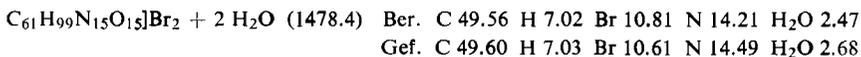
¹⁵ L. Zervas und Mitarbb.⁶⁾ geben an: Schmp. 138–139°; $[\alpha]_D^{20}$: $+15.5^\circ$ ($c = 1$; in Chlf.).

¹⁶ E. D. Nicolaidis und Mitarbb.⁸⁾: Schmp. 126–127°; keine Angabe der spezif. Drehung.

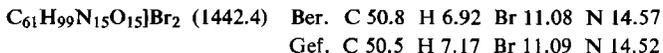
i. Vak. eingedampft. Die Lösung des Rückstands in wenig Methanol wird mit Äther versetzt, die Fällung abfiltriert und i. Vak. bei 80° über P₂O₅ getrocknet: Schmp. 174–175°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-32.5 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -38.9° ($c = 1$; in Methanol), $[\alpha]_{546}^{20}$: $-27.58 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.07° ($c = 1$; in 80-proz. Essigsäure). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 8.5 g (95%).



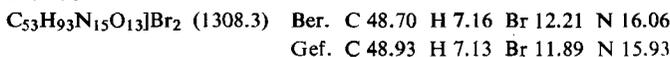
16. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-alanyl-*L*-glutaminyll-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-*tert*-butylester [16-23a]: 80 g *Arg*(HBr)-*Arg*(HBr)-*Ala*-*Glu*(NH₂)-*Asp*(*OtBu*)-*Phe*-*Val*-*OtBu*-*AcOH* [17-23b-Acetat] (Monohydrat) in ca. 2000 ccm Dimethylformamid werden bei -10° mit 35 g *Z*-*Ser*(*tBu*)-*ONP* [16b]¹⁷⁾ versetzt. Man rührt 10 Stdn. bei 0° und 40 Stdn. bei Raumtemp. und nimmt nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. den Rückstand in wenig Methanol auf; auf Zusatz von viel Äther tritt Fällung ein. Das abfiltrierte Material wird in 200 ccm Dimethylformamid/Methanol (1:1) unter Zusatz von wenig Wasser aufgenommen, die erhaltene Lösung unter Zusatz von Aktivkohle 10 Min. auf 50° erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird unter Rühren mit viel Essigester versetzt; nach mehrstdg. Belassen im Kühlschrank wird der gebildete Niederschlag abfiltriert und 4 Stdn. bei 60° i. Vak. getrocknet: Schmp. 179–180°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-32.9 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -40.2° ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 87.5 g (90.1%).



Nach Trocknen bei 80° und 10⁻³ Torr erhält man das Octapeptid-Derivat wasserfrei: Schmp. 186–187°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-33.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -40.95° ($c = 1$; in Methanol).



17. *O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-alanyl-*L*-glutaminyll-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-*tert*-butylester [16-23b]: 89.1 g *Z*-*Ser*(*tBu*)-*Arg*(HBr)-*Arg*(HBr)-*Ala*-*Glu*(NH₂)-*Asp*(*OtBu*)-*Phe*-*Val*-*OtBu* [16-23a] in 4000 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert. Das Filtrat wird mit Aktivkohle und Hyflo-Cel auf 60° unter Rühren erwärmt, filtriert und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in wenig heißem Methanol aufgenommen, die Lösung mit Äther versetzt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und bei 80° i. Vak. getrocknet: amorphes Pulver; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-38.7 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -46.7° ($c = 1$; in Methanol). Ausb. 75.95 g (94%).



18. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^δ-phthaloyl-*L*-ornithyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-alanyl-*L*-glutaminyll-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-*tert*-butylester [17-23c]: 9.9 g *H*-*Arg*(HBr)-*Ala*-*Glu*(NH₂)-*Asp*(*OtBu*)-*Phe*-*Val*-*OtBu*-*AcOH* [18-23b-Acetat] (wie oben unter II. beschrieben) in 120 ccm Dimethylformamid werden bei 0° mit 5.7 g *Z*-*Orn*(*PHT*)-*ONP* [17g]¹⁸⁾ versetzt; die Mischung wird 5 Stdn. bei 0° und 40 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Filtrat dampft man i. Vak. zur Trockne ein und digeriert den Rückstand zweimal mit

¹⁷⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 99, 105 (1966).

¹⁸⁾ Schmp. 136–138°; $[\alpha]_{546}^{20}$: $-35.5 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -43.06° ($c = 2$; in Dimethylformamid + 1% Essigsäure); M. Bodanszky und Mitarbb.⁴⁾ geben an: Schmp. 135–137°; $[\alpha]_{546}^{20}$: -34° ($c = 2$; in Dimethylformamid + 1% Essigsäure).

absol. Äther. Nach zweimaligem Umfällen aus Dimethylformamid/Wasser (1:3) unter Zusatz von wenig Essigsäure amorphes Pulver: Schmp. 204–205°; $[\alpha]_D^{20}$: $-21.7 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -26.25° ($c = 1$; in Dimethylformamid + 2 % Essigsäure). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 12.5 g (95.5%).

$C_{61}H_{85}N_{12}O_{15}Br$ (1306.4) Ber. C 56.1 H 6.56 N 12.87 Gef. C 56.0 H 6.55 N 13.07

19a. *N*^δ-Phthaloyl-L-ornithyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester-acetat [17-23d-Acetat]: 6 g *Z-Orn(PHT)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [17-23c] in 200 ccm Methanol/Eisessig/Wasser (2:2:1) werden in Gegenwart von Palladiumschwarz wie üblich hydriert. Der nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhaltene Rückstand wird mit 60° warmem Wasser erschöpfend extrahiert; die vereinigten Extrakte werden i. Vak. zur Trockne gebracht. Nach Umfällen aus Äthanol/Äther und Trocknen bei 10⁻³ Torr amorphes Pulver: Schmp. 145–170° (Zers.). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 4 g (68 %).

$C_{55}H_{83}N_{12}O_{15}Br + 3 H_2O$ (1286.3) Ber. C 51.37 H 6.87 N 13.07
Gef. C 51.33 H 7.15 N 13.07

19b. *N*^δ-Phthaloyl-L-ornithyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [17-23d]: 6 g *Z-Orn(PHT)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [17-23c] in 200 ccm Dimethylformamid/Methanol/Wasser (3:2:1) werden bei 35–40° in Gegenwart von Palladiumschwarz 8 Stdn. wie üblich hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand aus Äthanol/Äther umgefällt. Nach Trocknen bei 10⁻³ Torr amorphes Pulver: Schmp. 175–180° (Zers.). Chromatogr. rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 5.1 g (95 %).

$C_{53}H_{79}N_{12}O_{13}Br$ (1172.2) Ber. C 54.30 H 6.80 N 14.35 Gef. C 54.42 H 7.05 N 14.35

20a. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-*N*^δ-phthaloyl-L-ornithyl-L-arginyl(¹/₃Citrat)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [16-23c-Citrat]: 7.15 g *H-Orn(PHT)-Arg(HBr)-Ala-Glu(NH₂)-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu* [17-23d] oder 7.85 g des Acetats [17-23d-Acetat] in 200 ccm Dimethylformamid werden bei –10° mit 3.0 g *Z-Ser(tBu)-ON P*[16b] versetzt. Nach 20stdg. Rühren bei Raumtemp. entfernt man das Lösungsmittel i. Vak.; der feinpulverisierte Rückstand wird mehrfach mit Äther extrahiert, das erhaltene Produkt mehrfach nacheinander mit 0.2*n* NH₃ bzw. 0.2*n* Citronensäure-Lösung verrieben, auf das Filter gebracht und mit Wasser gut gewaschen. Noch feucht aus Methanol umkristallisiert: Schmp. 220–221°. Chromatogr. rein in n-Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2). Ausb. 6.50 g (73.7%).

$C_{68}H_{97}N_{13}O_{17} + \frac{1}{3}C_6H_8O_7 + \frac{1}{3}H_2O$ (1438.7) Ber. C 58.44 H 7.03 N 12.66
Gef. C 58.40 H 7.20 N 12.89

20b. *N*^α-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-*N*^δ-phthaloyl-L-ornithyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [16-23c]: 3.37 g des unter 20a. erhaltenen *Octapeptid-citrats* [16-23c-Citrat] in 100 ccm Dimethylformamid werden unter Eiskühlung und Rühren vorsichtig mit 2.34 ccm *n HBr* versetzt. Die Lösung wird bei 10⁻¹ Torr zur Trockne eingedampft, der Rückstand mehrfach mit Äther zur Entfernung von Citronensäure ausgekocht. Amorphes Pulver: Schmp. 185° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: $-20.23 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -24.3° ($c = 1$; in Dimethylformamid). Chromatogr. rein in n-Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2). Ausb. 3.45 g (quantitativ).

$C_{68}H_{98}N_{13}O_{17}Br + 2 H_2O$ (1485.6) Ber. C 54.98 H 6.92 N 12.26
Gef. C 55.07 H 6.83 N 12.51

Aminosäureanalyse:	Ser	Orn	Arg	Ala	Glu	Asp	Phe	Val
Ber.:	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.:	0.92	0.98	0.97	0.97	1.02	1.00	0.97	0.98

21. *N^α-tert.-Butyloxycarbonyl-N^ω-nitro-L-arginin-benzyloxycarbonylhydrazid* [17e]: 19.57 g *BOC-Arg(NO₂)-OH* [17]¹⁹ in 400 ccm absol. Tetrahydrofuran (in der Siedehitze gelöst) werden bei -15° mit 7 ccm *Triäthylamin* und anschließend unter Rühren mit 4.78 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* tropfenweise versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei -15° läßt man in die Lösung des gemischten Anhydrids 10.5 g *Benzyloxycarbonylhydrazin-hydrochlorid*²⁰ und 7 ccm *Triäthylamin* in 80 ccm Chloroform einfließen. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bei -10° und 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, das Filtrat vom ausgeschiedenen *Triäthylammoniumchlorid* i. Vak. eingedampft. Aus der Lösung des Rückstandes in heißem Essigester kristallisieren im Kühlschrank feine Nadeln aus; aus Äthanol/Wasser (3:2) Schmp. $157-158^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-20.35 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -24.21° ($c = 1.5$; in Methanol). Chromatogr. rein in *n*-Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2). Ausb. 21.45 g (92%).

$C_{19}H_{29}N_7O_7$ (467.5) Ber. C 48.82 H 6.25 N 20.97 Gef. C 49.06 H 6.28 N 21.28

22. *N^ω-Nitro-L-arginin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid* [17f-Hydrochlorid]: 42 g *BOC-Arg(NO₂)-NHNH-Z* [17e] werden mit 300 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und bis zur vollständigen Lösung geschüttelt (ca. 2 Stdn.). Anschließend dampft man überschüss. *Trifluoressigsäure* i. Vak. bei 10^{-1} Torr ab. Der verbleibende ölige Rückstand wird in Methanol aufgenommen, das Filtrat unter Eiskühlung mit 90 ccm *n* HCl versetzt. Die erhaltene Lösung wird i. Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand aus Äthanol/Äther umgefällt: Zers.-P. ab 100° ; $[\alpha]_{D}^{20}$: $+24.0 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+28.3^{\circ}$ ($c = 1$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 34.1 g (94%).

$C_{14}H_{22}N_7O_5Cl$ (403.8) Ber. C 41.64 H 5.49 Cl 8.78 N 24.28
Gef. C 41.61 H 5.57 Cl 8.78 N 24.0

23. *N-Phthaloyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N^ω-nitro-L-arginin-benzyloxycarbonylhydrazid* [16-17a]: 15 g *PHT-Ser(tBu)-OH* [16d]²¹ in 250 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei -15° mit 7.2 ccm *Triäthylamin* und anschließend unter Rühren mit 4.9 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* tropfenweise versetzt. Nach 15 Min. Rühren bei -15° wird die Lösung des gemischten Anhydrids mit 20.8 g *H-Arg(NO₂)-NHNH-Z-HCl* und 7.2 ccm *Triäthylamin* in 150 ccm *Dimethylformamid* wie üblich umgesetzt. Die Mischung wird 2 Stdn. bei -10° und 3 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, das Filtrat vom ausgeschiedenen *Triäthylammoniumchlorid* i. Vak. eingengt. Die Lösung des Rückstands in Essigester wird wie üblich mit Citronensäure/Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Feine Nadeln aus Essigester/Diäthyläther: Schmp. $105-108^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-22.87 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -27.4° ($c = 1.3$; in Methanol). Chromatogr. rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 25.5 g (77%).

$C_{29}H_{36}N_8O_9$ (640.7) Ber. C 54.37 H 5.67 N 17.50 Gef. C 54.10 H 6.06 N 17.82

¹⁹ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 3312 (1964).

²⁰ E. Wünsch, Chem. Ber. 98, 797 (1965).

²¹ Hergestellt im hiesigen Laboratorium von E. Jaeger durch Phthaloylierung von *O*-tert.-Butyl-serin: Schmp. $145-147^{\circ}$; $[\alpha]_{D}^{20}$: $-57.6 \pm 1^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -68.8° ($c = 1$; in Äthanol). [185/66]