

Erich Wünsch und Gerhard Wendlberger

Zur Synthese des Glucagons, XIV<sup>1)</sup>

## Darstellung der Sequenz 16—29 des Glucagons

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

(Eingegangen am 16. September 1966)

Die Synthese der allseits geschützten Tetradecapeptid-Sequenz 16—29 des Glucagons Phthaloyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester [16-29a] durch Verknüpfung des Octapeptidesters L-Phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-*O*-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester [22-29c] mit dem Acylhexapeptid Phthaloyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [16-21b] wird beschrieben.

Gestützt auf die Erfahrungen aus der Synthese von Z-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu<sup>2)</sup> stellten wir zunächst das analoge *N*-Phthaloylgeschützte Hexapeptid [16-21b] dar:

Durch Verknüpfen von H-Gln-Asp(OtBu)-OMe [20-21f] mit Z-Ala-OH [19] zu Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe [19-21a] und hydrogenolytische Abspaltung der Aminoschutzgruppe war H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe [19-21c] leicht zugänglich. Dieser Peptidester konnte mit Z-Arg-OH·HCl [18c], besser mit dem entsprechenden Hydrobromid [18b] wie üblich nach dem Carbodiimidverfahren zum Benzyl-oxycarbonyl-tetrapeptidester [18-21a bzw. b] umgesetzt werden; wobei die höchsten Ausbeuten in Gegenwart von mindestens 1 Äquiv. *N*-Hydroxy-succinimid erzielt wurden<sup>3)</sup>.

Alkalische Verseifung von [18-21a und b] führte zum Acyl-tetrapeptid [18-21d], katalytische Hydrogenolyse des letzteren in Gegenwart von Salzsäure bzw. Essigsäure schließlich zu H-Arg(HCl)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH [18-21f]\* bzw. H-Arg(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH [18-21g]\*.

\* Es muß offengelassen werden, ob bei den „zwitterionischen“ Verbindungen [18-21f und g] bzw. [17-21c und d] die Salz-Bildung an der (einer) Guanido- oder an der  $\alpha$ -Aminogruppe erfolgt.

<sup>1)</sup> XIII. Mitteil.: E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 100, 816 (1967), vorstehend.

<sup>2)</sup> E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. 100, 160 (1967).

<sup>3)</sup> E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966); F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966).



Ausbeute an. Anschließende hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen erbrachte fast quantitativ das freie Pentapeptid, isoliert als H-Arg-(HBr)-Arg(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH [17-21c]\*) oder als H-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH [17-21d]\*).

Das Pentapeptid [17-21c] war ferner im „Alternativweg“ aus H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe [19-21c] nach zweimaligem Anknüpfen von Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-ONP über die Zwischenstufen [18-21c], [18-21e], [17-21a] und [17-21b] zugänglich. Lediglich bei größeren Ansätzen ließ sich die alkalische Verseifung von Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-Arg(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe [17-21a] nicht mehr eindeutig in Richtung des Tris-benzyloxycarbonyl-pentapeptids [17-21b] lenken. Das erhaltene Verseifungsprodukt war chromatographisch uneinheitlich; Behandeln mit katalytisch erregtem Wasserstoff in Gegenwart von Essigsäure (und anschließende Titration mit Bromwasserstoffsäure) führte jedoch zu einer einheitlichen ninhydrin-positiven Verbindung, die sich in allen Eigenschaften als identisch mit dem oben genannten Pentapeptid [17-21c] auswies (z. B.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-27.8 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-33.4^\circ$  ( $c = 1$ ; in  $H_2O$ )). Aufgrund dieser Ergebnisse dürfte es sicher sein, daß bei der alkalischen Esterverseifung von [17-21a] die N-Guanyl-Diacyl-Blockierung teilweise angegriffen wird.

Das Pentapeptid [17-21c] ließ sich mit PHT-Ser(tBu)-ONP [16e] zum gewünschten PHT-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH [16-21a] vereinigen; im Hinblick auf die anschließende Umsetzung wurde [16-21a] letztlich durch Titration mit Bromwasserstoffsäure in das Dihydrobromid [16-21b] übergeführt.

Die Verknüpfung von [16-21b] mit dem Octapeptidester H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [22-29c] (s. die vorstehende Mittel.) zum chromatographisch und analytisch reinen Phthaloyl-tetradecapeptid-ester [16-29a] nach dem Carbo-diimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren<sup>3)</sup> bereitete keine besonderen Schwierigkeiten.

Frau U. Strobel und Herrn K. Friedrich danken wir für ihre ausgezeichnete experimentelle Mithilfe, Fräulein R. Scharf für die Ausführung der Aminosäure-Analysen. Die Elementaranalysen-Werte wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leiter W. Beck) ermittelt.

## Beschreibung der Versuche

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

1. L-Glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester-hydrochlorid [20-21f·HCl]: 72 g Z-Gln-Asp(OtBu)-OMe [20-21a]<sup>4)</sup> in 1000 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz wie üblich hydriert, wobei durch Zutropfen von HCl in Methanol ein pH-Wert von 5 der Reaktionslösung eingehalten wird. Nach dem Ende der Kohlendioxid-Entwicklung wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der amorphe Rückstand kristallisiert aus Acetonitril: hygroskopische Nadeln vom Schmp.  $122 - 125^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+17.3 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+20.9^\circ$  ( $c = 1.5$ ; in Methanol). Ausb. 56 g (98 %).

<sup>4)</sup> E. Wünsch, Chem. Ber. 98, 797 (1965).

2. *Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-glutaminyll-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester* [19-21 a]: Die Lösungen von 33.9 g *Z-Ala-OH* [19] und 21.3 ccm Triäthylamin in 200 ccm Acetonitril sowie 56 g *H-Gln-Asp(OtBu)-OMe·HCl* [20-21 f·HCl] in 500 ccm Acetonitril/Dimethylformamid (1 : 1) werden bei  $-10^\circ$  vereinigt und 15 Min. gerührt. Nach Zusatz von 31.4 g *Dicyclohexylcarbodiimid* rührt man das Reaktionsgemisch 5 Stdn. bei  $-10^\circ$  und anschließend 18 Stdn. bei Raumtemp. Nach Abkühlen auf  $0^\circ$  wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, die Lösung i. Vak. zur Trockene eingedampft, der Rückstand in viel heißem Essigester aufgenommen, die Lösung auf Raumtemp. abgekühlt und wie üblich mit Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. auf ein kleines Volumen eingengt. Das ausgefallene Tripeptid-Derivat wird aus wenig Methanol umkristallisiert: Nadeln vom Schmp.  $174-176^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-30.49 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-36.7^\circ$  ( $c = 1.2$ ; in Methanol). Ausb. 60 g (73 %).

$C_{25}H_{36}N_4O_9$  (536.6) Ber. C 55.96 H 6.76 N 10.44 Gef. C 56.12 H 6.71 N 10.69

3. *Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-glutaminyll-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [19-21 b]: 29.0 g *Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21 a] in 250 ccm Dioxan/Wasser (1 : 1) werden wie üblich innerhalb 2 Stdn. mit 27 ccm 2*n* NaOH unter Eiskühlung verseift (Thymolphthalein als Indikator). Nach weitgehender Neutralisation des Reaktionsansatzes mit 53 ccm *n* HCl entfernt man Dioxan weitgehend i. Vak.; dabei beginnt das *Benzyloxycarbonyl-tripeptid* auszufallen. Nach Zusatz von wenig Citronensäurelösung (in geringem Überschuß) wird die Mischung kurze Zeit geschüttelt. Das abfiltrierte Material wird mit Wasser sorgfältig gewaschen und schließlich aus Wasser/Äthanol umkristallisiert: Schmp.  $163-164^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-22.0 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-25.93^\circ$  ( $c = 1.6$ ; in Methanol). Ausb. 27.7 g (98 %).

$C_{24}H_{34}N_4O_9$  (522.6) Ber. C 55.15 H 6.56 N 10.72 Gef. C 54.74 H 6.36 N 10.66

4a. *L-Alanyl-L-glutaminyll-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester* [19-21 c]: 22.1 g *Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21 a] in 500 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz als Katalysator wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand kristallisiert aus Essigester in farblosen Nadeln: Schmp.  $107-109^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-9.6 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-12.03^\circ$  ( $c = 2$ ; in Methanol). Ausb. 16.6 g (quantitativ).

$C_{17}H_{30}N_4O_7$  (402.5) Ber. C 50.73 H 7.51 N 13.92 Gef. C 50.92 H 7.41 N 13.99

4b. *L-Alanyl-L-glutaminyll-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester-hydroacetat* [19-21 c·CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H]: 22.1 g *Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21 a] in 500 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz und 1 Äquiv. *Eisessig* wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand kristallisiert aus Essigester: mikrokristallines Pulver vom Schmp.  $112-114^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-7.47 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-8.86^\circ$  ( $c = 2$ ; in Methanol). Ausb. 19 g (quantitativ).

$C_{17}H_{31}N_4O_7$ CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> (462.5) Ber. C 49.34 H 7.41 N 12.11 Gef. C 49.58 H 7.32 N 12.27

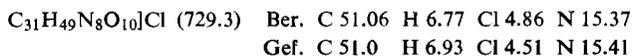
4c. *L-Alanyl-L-glutaminyll-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester-hydrochlorid* [19-21 c·HCl]: 22.1 g *Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21 a] in 400 ccm Methanol werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz unter gleichzeitiger Titration der freigesetzten Aminogruppe mit *Chlorwasserstoff* in Methanol (pH 5) wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene ölige Rückstand kristallisiert aus Acetonitril: Schmp.  $158^\circ$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-4.44 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-5.74^\circ$  ( $c = 1.5$ ; in Methanol). Ausb. 17.8 g (fast quantitativ).

$C_{17}H_{31}N_4O_7$ Cl (438.9) Ber. C 46.52 H 7.12 Cl 8.08 N 12.77  
Gef. C 46.57 H 7.22 Cl 8.28 N 12.59

(Für die weitere Umsetzung eignet sich auch das ölige rohe Tripeptidester-hydrochlorid.)

4d. *L-Alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester-hydrobromid* [19-21c·HBr]: 50.3 g *Z-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21a] in 1000 ccm Methanol werden bei Gegenwart von Palladium-Schwarz und gleichzeitiger Titration der freigesetzten Aminogruppe mit *n* HBr in Methanol (pH 5) wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene feste Rückstand wird mit absol. Äther digeriert, auf die Nutsche gebracht, mit Äther gewaschen und schließlich i. Vak. scharf getrocknet. Ausb. 44 g (97%).

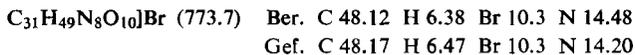
5a. *Benzyloxycarbonyl-L-arginyl(hydrochlorid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester* [18-21a]: Die vereinigten Lösungen von 6.0 g *H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21c] in 80 ccm Acetonitril und 5.2 g *Z-Arg(HCl)-OH* [18c] in 50 ccm Dimethylformamid werden bei  $-10^\circ$  mit 3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und 3 Tage bei  $0-5^\circ$  und anschließend 10 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf  $-10^\circ$  wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, die Lösung anschließend i. Vak. eingedampft und der erhaltene Rückstand in warmem Äthanol aufgenommen; auf Zusatz von wenig Wasser scheidet sich die restliche Menge Dicyclohexylharnstoff ab. Das Filtrat dampft man i. Vak. schonend zur Trockne ein. Der über  $P_2O_5$  i. Vak. scharf getrocknete Rückstand erstarrt beim Verreiben mit absol. Essigester; das feste Material wird abfiltriert, in wenig heißem Äthanol aufgenommen und die Lösung mit Essigester bis zur Trübung versetzt. Die alsbald einsetzende Kristallisation wird durch mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt. Nach Abfiltrieren und Trocknen i. Vak. über  $P_2O_5$  Schmp.  $167-169^\circ$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-28.7 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-34.8^\circ$  ( $c = 2$ ; in Methanol). Ausb. 7.1 g (65%).



5b. *Benzyloxycarbonyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester* [18-21b]

a) 43.8 g *H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe·HBr* [19-21c·HBr], 29 g *Z-Arg-OH* [18a] und 2.0 g *Z-Arg(HBr)-OH* [18b] in 300 ccm Pyridin werden bei  $-15^\circ$  mit 20 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach 50stdg. Rühren bei  $0^\circ$  wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. zur Trockene eingedampft, der erhaltene feste Rückstand mit absol. Äther digeriert und anschließend zweimal aus Methanol/Essigester umgefällt: Schmp.  $172-173^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-27.2 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-32.8^\circ$  ( $c = 2$ ; in Methanol). Ausb. 45 g (64%).

b) 30.8 g *H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [19-21c], 32.5 g *Z-Arg(HBr)-OH* [18b] und 10 g *N-Hydroxy-succinimid* in ca. 400 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^\circ$  mit 17.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bei  $0^\circ$  und 20 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und schließlich auf  $-15^\circ$  abgekühlt. Man filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft das Filtrat i. Vak. zur Trockene ein. Der erhaltene Rückstand wird dreimal aus Methanol/Essigester umgefällt: Schmp.  $171-173^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-27.3 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-32.88^\circ$  ( $c = 2$ ; in Methanol). Ausb. 48 g (80%).



5c. *N $^{\alpha}$ ,N $^{\delta}$ ,N $^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester* [18-21c]: 22.2 g *H-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe·AcOH* [19-21c·AcOH] in 1300 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^\circ$  mit 40 g *Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-ONP* [18d] versetzt, die erhaltene Reaktionsmischung 50 Stdn. bei  $0^\circ$  gerührt. Nach Abkühlen auf  $-15^\circ$  wird das ausgefallene Produkt abfiltriert und anschließend nacheinander mit absol.

Äthanol bzw. absol. Essigester jeweils 2 Stdn. unter Rühren digeriert. Nach Trocknen i. Vak. Schmp. 225°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-9.7 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-11.1^\circ$  ( $c = 0.9$ ; in Eisessig). Ausb. 45.5 g (99 %).

$C_{47}H_{60}N_8O_{14}$  (961.1) Ber. C 58.74 H 6.30 N 11.66 Gef. C 58.75 H 6.28 N 11.67

6. *Benzoyloxycarbonyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [18-21 d]: 77.37 g *Z-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [18-21 b] in 750 ccm Wasser werden unter pH-Kontrolle mit 200 ccm *n NaOH* unter Rühren verseift (der Anfangs-pH-Wert von 5.5 der Reaktionslösung erreicht nach Zugabe der ersten Tropfen Natronlauge einen Wert von 11, der im Verlauf der Zugabe von ca. 100 ccm *n NaOH* zunächst bestehen bleibt; die restlichen 100 ccm Natronlauge werden anschließend bei einem pH-Wert von 11.7–12 langsam zugetropft). Anschließend läßt man unter Kühlung mit Eiswasser 100 ccm *n HCl* langsam unter Rühren zufließen, wobei der pH-Wert der Lösung auf 4.5 abfällt. Das abgeschiedene Material wird abfiltriert und aus Methanol/Wasser (1 : 1) umkristallisiert: farblose Nadeln vom Schmp. 237° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.56 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-23.5^\circ$  ( $c = 1.5$ ; in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 67.6 g (97 %).

$C_{30}H_{48}N_8O_{11}$  (696.8) Ber. C 51.71 H 6.94 N 16.1 Gef. C 51.74 H 6.82 N 16.23

7. *L-Arginyl(hydroacetat)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methyl ester-hydroacetat* [18-21 e.  $CH_3CO_2H$ ]: 44.5 g *Z-Arg( $\delta$ - $\omega$ -Z-Z)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe* [18-21 c] in 2000 ccm Essigsäure/Methanol (1 : 1) werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand wird mehrere Male mit absol. Äther digeriert, auf das Filter gebracht, mit absol. Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet. Amorphes Pulver,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.14 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-25.55^\circ$  ( $c = 1$ ; in Äthanol). Ausb. 30.8 g (97.5 %).

$C_{23}H_{44}N_8O_8]2CH_3CO_2$  (678.8) Ber. C 47.77 H 7.44 N 16.5 Gef. C 47.81 H 7.29 N 15.9

8a. *L-Arginyl(hydrochlorid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [18-21 f]: Die Suspension von 4.75 g *Z-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [18-21 d] in 250 ccm Methanol und 50 ccm Essigsäure wird in Gegenwart von Palladium-Schwarz wie üblich hydriert, wobei im Zuge der fortschreitenden Entacylierung eine klare Lösung entsteht. Nach beendeter Kohlendioxid-Entwicklung dampft man das Filtrat vom Katalysator i. Vak. ein. Der verbleibende ölige Rückstand wird in wenig wäbr. Methanol aufgenommen, die Lösung vorsichtig unter Rühren und Kühlung mit 6.9 ccm *n HCl* versetzt und anschließend i. Vak. eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in wenig heißem Methanol scheidet auf Zusatz von absol. Äthanol bei mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank ein gallertiges Produkt ab; es wird abgenutscht und mit Äther behandelt. Nach 2stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird das nunmehr leicht filtrierbare Material auf das Filter gebracht und i. Vak. über  $P_2O_5$  und Kaliumhydroxid getrocknet. Amorphes Pulver,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-18.0 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-21.7^\circ$  ( $c = 1.2$ ; in Wasser). Ausb. 4.0 g (95 %).

$C_{22}H_{41}N_8O_8]Cl \cdot 2H_2O$  (617.1) Ber. C 42.82 H 7.35 Cl 5.75 N 18.16

Gef. C 43.01 H 7.15 Cl 5.98 N 18.33

8b. *L-Arginyl(hydroacetat)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [18-21 g]: 34.8 g *Z-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [18-21 d] in 800 ccm Methanol, 200 ccm Eisessig und 15 ccm Wasser werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Der erhaltene Rückstand wird mehrfach mit absol. Äther digeriert, auf das Filter gebracht und schließlich i. Vak. getrocknet. Amorphes Pulver,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-20.5 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-24.14^\circ$  ( $c = 1.2$ ; in Wasser). Ausb. 31.0 g (quantitativ).

$C_{22}H_{41}N_8O_8]CH_3CO_2 \cdot H_2O$  (623.0) Ber. C 46.16 H 7.47 N 18.05

Gef. C 46.35 H 7.67 N 17.95

9.  $N^{\alpha}, N^{\delta}, N^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginyl(hydroacetat)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester- $\alpha$ -methylester [17-21 a]: 25.0 g *H-Arg(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OMe·AcOH* [18-21 e·AcOH] in 500 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^{\circ}$  mit 30.0 g *Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-ONP* [17 d] versetzt, 25 Stdn. bei  $0^{\circ}$  und weitere 25 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der verbleibende Rückstand mehrfach mit Essigester und anschließend mit Wasser digeriert; das abzentrifugierte Material wird mit Methanol und Äther gewaschen und schließlich zweimal aus Dimethylformamid/Äther umgefällt. Mikrokristallines Pulver, Schmp.  $161-162^{\circ}$ ;  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $-15.7 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-18.96^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 36.9 g (85%).

$C_{53}H_{73}N_{12}O_{15}$  (1177.3) Ber. C 56.1 H 6.50 N 14.27

Gef. C 55.9 H 6.53 N 14.26

10.  $N^{\alpha}, N^{\delta}, N^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [17-21 b]: 29.6 g *H-Arg(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [18-21 g] in 500 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^{\circ}$  mit 40.0 g *Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-ONP* [17 d] versetzt, 30 Stdn. bei  $0^{\circ}$  und weitere 20 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Die i. Vak. auf ein kleines Volumen eingeeengte Reaktionslösung gießt man unter Rühren in warmen Essigester; der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit Essigester und Äther gewaschen, mit Wasser digeriert, erneut abfiltriert und letztlich mit Methanol und Äther gewaschen, das erhaltene Material aus Dimethylformamid/Essigester umgefällt, mit Essigester gewaschen und i. Vak. scharf getrocknet. Amorphes Pulver, Schmp.  $230^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $-15.5 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-18.2^{\circ}$  ( $c = 1.5$ ; in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 48.7 g (93%).

$C_{52}H_{70}N_{12}O_{15}$  (1103.2) Ber. C 56.6 H 6.40 N 15.24 Gef. C 56.6 H 6.45 N 15.14

11. *L-Arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydroacetat)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [17-21 c]: 48.2 g *Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [17-21 b] in 800 ccm Methanol und 500 ccm *Eisessig* werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz wie üblich hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird nach vorsichtiger Titration mit 43.5 ccm *n HBr* i. Vak. zur Trockene gebracht, der erhaltene Rückstand mit Äther digeriert und schließlich aus absol. Äthanol umkristallisiert. (Das mikrokristalline Produkt ist sehr schwer filtrierbar und wird am zweckmäßigsten durch Zentrifugieren abgetrennt.) Nach Waschen mit Äther und Trocknen i. Vak. mikrokristallines Pulver,  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $-27.2 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-32.6^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Wasser) oder  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $-10.7 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-12.7^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 36.5 g (97.6%).

$C_{28}H_{54}N_{12}O_9$ Br·CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (859.8) Ber. C 41.85 H 6.93 Br 9.30 N 19.55

Gef. C 41.57 H 7.05 Br 9.54 N 19.66

12. *L-Arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [17-21 d]: Die Suspension von 4.8 g *Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [17-21 b] in 300 ccm Methanol/Dimethylformamid (1:1) wird bei Gegenwart von Palladium-Schwarz und gleichzeitiger Titration der freigesetzten Aminogruppe mit 87 ccm 0.1 *n HBr* bei pH 4–4.5 wie üblich hydriert, wobei sich das Ausgangsmaterial löst. Das Filtrat vom Katalysator wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand zweimal mit absol. Äther digeriert. Beim Behandeln des amorphen Rückstandes mit heißem absol. Äthanol tritt Kristallisation ein: feine, sehr hygroskopische Nadeln von unscharfem Schmp.;  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $-26.6 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-31.0^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Wasser). Ausb. 3.5 g (94%).

$C_{28}H_{54}N_{12}O_9$ 2Br·C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (908.7) Ber. C 39.65 H 6.65 Br 17.6 N 18.5

Gef. C 39.65 H 6.80 Br 17.1 N 18.5

13. *Phthaloyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [16-21 a]: 6.3 g *H-Arg(HBr)-Arg(AcOH)-Ala-Gln-*

*Asp(OtBu)-OH* [17-21c] in 150 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^{\circ}$  mit 4.12 g *PHT-Ser(tBu)-ONP* [16e] versetzt, 24 Stdn. bei  $0^{\circ}$  und weitere 24 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand mehrere Male nacheinander mit Äther und Essigester digeriert, auf das Filter gebracht und mit Essigester gewaschen. Die Lösung des Rohproduktes in wenig Dimethylformamid wird in viel absol. Äther eingerührt, die gebildete Fällung abfiltriert und mit Äther gewaschen. Nach Umfällen aus absol. Äthanol (Zentrifugieren) amorphes Pulver vom Schmp.  $175^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-22.6 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-26.6^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Methanol). Ausb. 7.0 g (88%).

$C_{43}H_{68}N_{13}O_{13}Br \cdot 2 H_2O$  (1091.1) Ber. C 47.34 H 6.65 Br 7.33 N 16.69  
Gef. C 47.50 H 6.90 Br 7.39 N 16.32

14. *Phthaloyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester* [16-21b]: 6.5 g *PHT-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [16-21a] in 100 ccm Methanol/Wasser (1:1) werden unter Eiskühlung und Rühren mit 59.7 ccm 0.1 *n* HBr tropfenweise versetzt. Die erhaltene Lösung wird i. Vak. zur Trockene eingedampft (oder besser lyophilisiert), der Rückstand mit heißem Essigester digeriert, auf das Filter gebracht, mit Essigester und absol. Äther gewaschen und schließlich i. Vak. getrocknet. Amorphes Pulver, Schmp.  $115^{\circ}$  (Zers.),  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-20.3 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-24.2^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Methanol). Ausb. 6.7 g (94%).

$C_{43}H_{69}N_{13}O_{13}2 Br \cdot H_2O$  (1154.0) Ber. C 44.76 H 6.20 Br 13.85 N 15.78  
Gef. C 44.91 H 6.41 Br 13.76 N 15.68

15. *Phthaloyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [16-29a]: 11.5 g *H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu* [22-29c], 13.5 g *PHT-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH* [16-21b] und 2.76 g *N-Hydroxy-succinimid* werden in ca. 300 ccm Dimethylformamid unter Erwärmen und Rühren gelöst, die Mischung auf  $-15^{\circ}$  abgekühlt und anschließend mit 2.47 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 48 Stdn. bei  $0^{\circ}$  und 24 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Abkühlen auf  $-15^{\circ}$  wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat in ca. 2000 ccm heißen Essigester eingerührt, der gebildete Niederschlag nach mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschränk abfiltriert und mit Essigester bzw. Äther gewaschen. Diese Operation wird nach Auflösen in Dimethylformamid nochmals wiederholt. Das erhaltene Produkt wird mit bidestilliertem Wasser bis zur Homogenität verrieben, die gallertige Masse zentrifugiert. Nach Wiederholung der Operation wird das so gewonnene Material mit Essigester behandelt, auf das Filter gebracht, mit Essigester und Äther sorgfältig gewaschen und bei  $60^{\circ}$  i. Vak. getrocknet. Amorphes Pulver, Schmp.  $224^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-31.3 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-37.2^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in 80-proz. Essigsäure); chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) bzw. in tert.-Butylalkohol/Eisessig/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. in n-Propanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 17.5 g (77.5%).

$C_{100}H_{154}N_{24}O_{24}S_2Br \cdot 2 H_2O$  (2304.4)

Ber. C 52.12 H 6.91 Br 6.93 N 14.59 O 18.05 S 1.39  
Gef. C 52.13 H 7.04 Br 6.80 N 14.44 O 17.92 S 1.57

Aminosäure-Analyse:

	Ser	Arg	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Trp	Leu	Met	Thr	NH <sub>3</sub>
Ber.	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	3
Gef.	0.85	1.96	0.99	1.99	2.04	1.01	1.03	—	1.03	0.97	0.96	3.14

[390/66]