

Rolf Geiger, Karl Sturm und Walter Siedel

***p*-Amino-benzoyl-lysin-vasopressin und *p*-Amino-phenylacetyl-oxytocin**

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)
(Eingegangen am 9. November 1967)

Als diazotierbare Derivate des Lysin-vasopressins und des Oxytocins wurden N^α -[*p*-Amino-benzoyl]-lysin-vasopressin und N -[*p*-Amino-phenylacetyl]-oxytocin hergestellt. — Der N -*p*-Amino-benzoylrest wird durch Natrium in flüss. Ammoniak abgespalten, während der N -*p*-Amino-phenylacetylrest unter denselben Bedingungen stabil ist. Die Dehydrierung von *p*-Amino-phenylacetyl-oxytocein¹⁾ mit Jod in Essigsäure führte überwiegend zu höhermolekularen Oxytocin-Derivaten mit einem Polymerisationsgrad $n > 25$.

Im Rahmen immunologischer Untersuchungen beschäftigten wir uns mit diazotierbaren Derivaten des Oxytocins und Lysin-vasopressins, die nach der Landsteiner-Technik²⁾ durch Kupplung mit den Tyrosin- oder Histidinresten von Proteinen oder mit dem im eigenen Molekül in Stellung 2 vorhandenen Tyrosin zu antigen wirksamen Verbindungen umgesetzt werden sollten.

Zunächst wurde das N^α -*p*-Amino-benzoylderivat **2** des Lysin-vasopressins (**1**) auf dem in Schema 1 aufgezeigten Wege hergestellt³⁾.

Das geschützte Hexapeptid **3**⁴⁾ wurde mittels Bromwasserstoff in Eisessig⁵⁾ vom Benzyloxycarbonylrest befreit und mit **4** zum Hexapeptidderivat **6** umgesetzt, das nach Auskochen mit Methanol ohne weitere Reinigung ins Hydrazid übergeführt wurde. Das entsprechende Azid **7** ergab mit dem Tripeptidamid **8**⁶⁾ das geschützte Nonapeptid **9**.

Nach der Abspaltung der Schutzgruppen durch Natrium in flüss. Ammoniak und anschließender Luftoxydation bei pH 8 wurde neben dem erwarteten Pab-Lysin-vasopressin (**2**) eine weitere, stärker basische Verbindung erhalten, die auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens als Lysin-vasopressin (**1**) erkannt wurde; während der Behandlung des Peptids mit Natrium in flüss. Ammoniak war der Pab-

1) Zur Nomenklatur vgl. *J. Photaki*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2292 (1966).

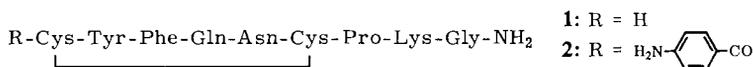
2) *K. Landsteiner*, *The Specificity of Serological Reactions*, Harvard Press, Cambridge (Mass.) 1945.

3) Abkürzungen entsprechend IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **348**, 256, 262 (1967); Weitere Abkürzungen: Pab = *p*-Amino-benzoyl-, Pap = *p*-Amino-phenylacetyl-.

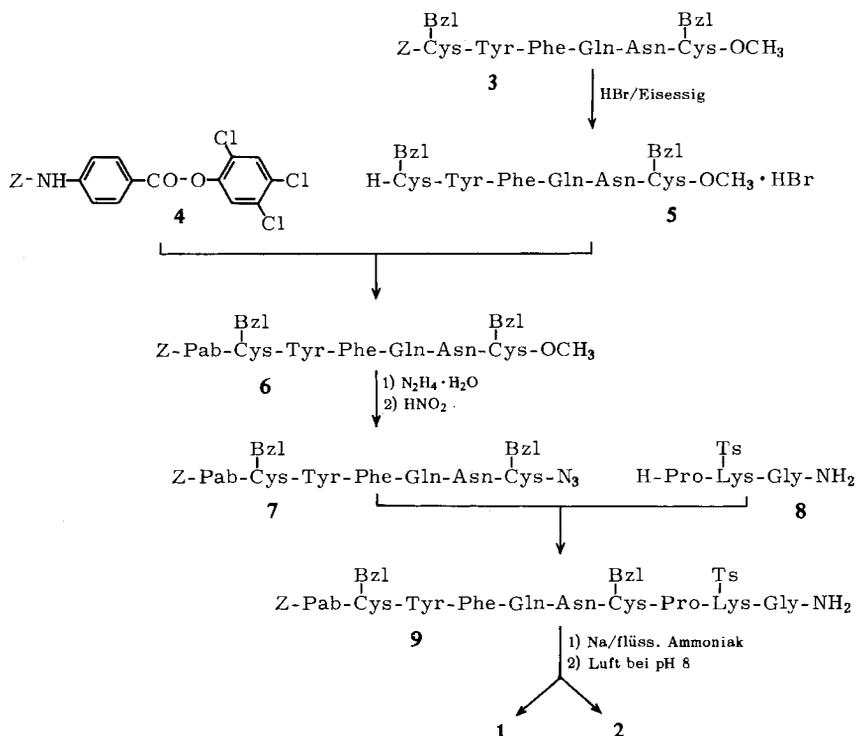
4) *R. O. Studer* und *V. du Vigneaud*, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 1500 (1960).

5) Eine Literaturzusammenfassung über die in der Peptidchemie gebräuchlichen Methoden findet sich bei *E. Schröder* und *K. Lübke*, *The Peptides*, Vol I, Academic Press, New York und London, 1965.

6) *R. A. Boissonnas* und *R. L. Huguenin*, *Helv. chim. Acta* **43**, 187 (1960).



Schema 1



Rest also teilweise entfernt worden. Diese Nebenreaktion erinnert an die Abspaltung der *N*-Benzoylgruppe durch elektrolitische Reduktion an einer Quecksilber-Kathode in Anwesenheit von Tetraalkylammoniumsalzen nach *Horner* und *Neumann*⁷⁾.

Nach diesen Erfahrungen wählten wir beim Oxytocin den *p*-Amino-phenylacetylrest als diazotierbare Gruppe in der Erwartung, daß als Folge der zwischen Benzolkern und Carboxylgruppe eingeschalteten CH₂-Gruppe in Analogie zu *Horner* und *Neumann*⁷⁾ die reduktive Spaltung durch Natrium in flüss. Ammoniak unterbliebe. Schema 2 zeigt den Aufbau des *N*-[*p*-Amino-phenylacetyl]-oxytoceins (Pap-Oxytocein) (16).

Das Octapeptid 11⁸⁾ wurde mit 10^{9,10)} zum Boc-Nonapeptid 12¹⁰⁾ umgesetzt, aus dem mittels Trifluoressigsäure die Boc-Gruppe abgespalten wurde. Reaktion mit 13

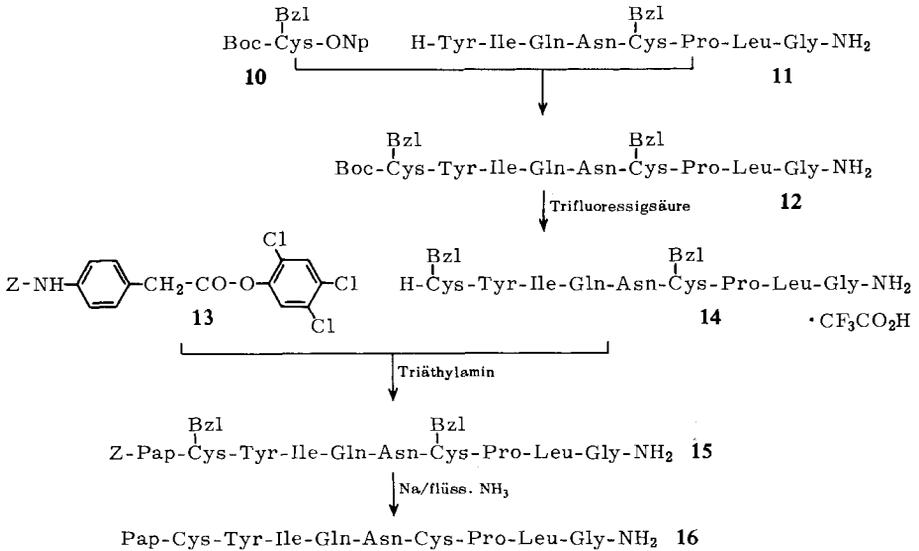
7) *L. Horner* und *H. Neumann*, Chem. Ber. **98**, 3462 (1965).

8) *M. Bodanszky* und *V. du Vigneaud*, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

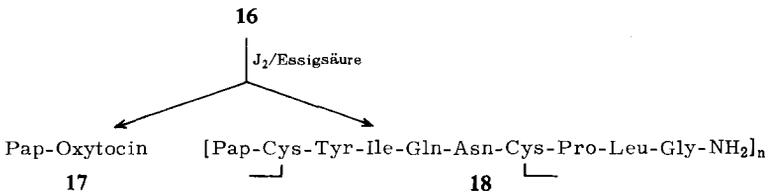
9) *G. W. Anderson*, *F. M. Callahan* und *J. E. Zimmerman*, Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 51 (1965).

10) *Farbwerke Hoechst AG* (Erf. *K. Sturm*, *R. Geiger* und *W. Siedel*), Niederländische Auslegeschrift Nr. 67/02924 vom 28. 8. 1967.

fürte zum *N*-[*p*-Benzyloxycarbonylamino-phenylacetyl]-bis-*S*-benzyl-oxytocein (**15**), das in üblicher Weise durch Behandeln mit Natrium in flüss. Ammoniak von den Schutzgruppen befreit wurde (**16**). Die Amidbindung zwischen *p*-Amino-phenylelessigsäure und Cystein blieb erhalten.

Schema 2³⁾

Schema 3



Pap-Oxytocin (**16**) ist in Wasser bei schwach saurer, neutraler oder schwach alkalischer Reaktion sehr schwer löslich, so daß die Oxydation durch Luft in wäßr. Medium in diesem Falle nicht möglich war. Wir dehydrierten deshalb mit Jod in Essigsäure. Unter den gewählten Bedingungen wurden weder *p*-Amino-phenylelessigsäure noch Tyrosin angegriffen, und nach dem Aufarbeiten durch Fällen mit Aceton und Umfällen aus Dimethylformamid/Wasser in Gegenwart von wenig Triäthylamin lag ein jodfreies Produkt vor.

Das auf diesem Wege (Schema 3) erhaltene Pap-Oxytocin war in Wasser sehr schwer löslich, löste sich jedoch gut in Säuren und Laugen. Die spezifische Drehung zeigte in 90proz. Essigsäure den unerwartet hohen Wert von $[\alpha]_D^{25} = -77.9^\circ$ ($c = 1$). Auch bei

der papier- und dünnschichtchromatographischen Prüfung war das Verhalten der Verbindung ungewöhnlich; der überwiegende Teil verharrte in allen gängigen Laufmitteln am Start.

Dieses Verhalten legte die Vermutung nahe, daß unser Pap-Oxytocin als höhermolekulare Verbindung vorlag, die durch Bildung „falscher“ Disulfidbrücken entstanden sein mußte (18). Die Säulenchromatographie an Sephadex® G-25 und G-50¹¹⁾ bestätigte diese Annahme. An beiden Typen entsprach bei der Chromatographie mit verd. Essigsäure als Elutionsmittel das Elutionsvolumen dem Ausschlußvolumen. Das Molekulargewicht mußte also höher als 10 – 12000 sein. Daneben wurden noch geringe Mengen einer Verbindung gefunden, deren Elutionsvolumen an Sephadex G-25 nur geringfügig über dem des Oxytocins lag. Wir nehmen an, daß es sich dabei um das Monomere handelt, das infolge des zusätzlichen aromatischen Rings etwas stärker an G-25 adsorbiert wird als Oxytocin.

Bei der Chromatographie einer etwas größeren Menge (50 mg) an Sephadex® G-25 wurde auch eine Verbindung mit einem dem dimeren Oxytocin entsprechenden Elutionsvolumen in sehr geringer Menge entdeckt. In der Tabelle werden die Elutionsvolumina V_e von Pap-Oxytocin mit denen des Oxytocins verglichen.

Elutionsvolumina V_e in ccm an Sephadex® G-25 und G-50

Verbindung	V_e an G-25	V_e an G-50
Dextranblau 2000	67	49
Oxytocin, monomer	133	130
Oxytocin, dimer	105	—
Pap-Oxytocin, monomer	141	138
Pap-Oxytocin, dimer	109	—
Pap-Oxytocin, polymer	64	50

Das Verhalten von 17/18 in der Ultrazentrifuge (Abbild. 1–3) stützte diese Befunde und ermöglichte eine ungefähre Abschätzung der Molekulargewichtsverteilung¹²⁾.

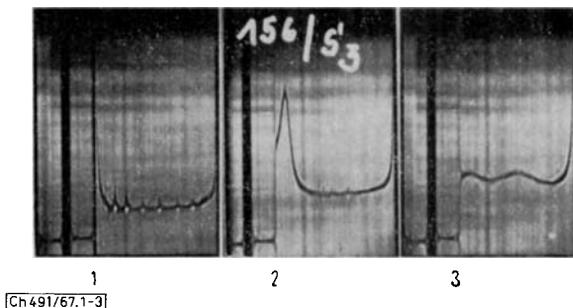
In Abbild. 1 erkennt man neben der Hauptkomponente, die sich noch nicht vom Meniskus gelöst hat, mehrere Komponenten im Molekulargewichtsbereich zwischen 50000 und 100000, daneben wenig Substanz mit einem Molekulargewicht > 100000 . In Abbild. 2 tritt die Hauptkomponente mit einem ungefähren Molekulargewicht von 30000 in Erscheinung, während sich in Abbild. 3 noch etwas mono- oder niedermolekulare Substanz vom Meniskus löst.

Die Schätzung des Molekulargewichts der Hauptkomponente ergab sich aus zwei Messungen der Sedimentationskonstante mit $S_{20} = 5.2 \times 10^{-13}$ und 4.6×10^{-13} und der nur ungenau zu ermittelnden Diffusionskonstante $D_{20} = 13.8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

Eine grobe Abschätzung der prozentualen Verteilung ergab für die Komponente vom ungefähren Molekulargewicht 30000 etwa 50%, etwa 40% besaßen ein Molekulargewicht > 50000 , der Rest war mono- bzw. niedermolekular.

¹¹⁾ Firma Pharmacia, Uppsala (Schweden).

¹²⁾ Wir danken Herrn Dr. H. Grötsch für Ausführung und Interpretation der Versuche.



Abbild. 1. Aufnahme 8 Min. nach Anlaufen der Zentrifuge bei 40000 U/Min.

Abbild. 2. 59780 U/Min.; Aufnahme nach 13 Min.

Abbild. 3. 59780 U/Min.; Aufnahme nach 77 Min.

Die Ursache für das bevorzugte Auftreten höhermolekularer Verbindungen dürfte nicht nur in der Methode der Oxydation mit Jod in Essigsäure in vergleichsweise hoher Konzentration zu suchen sein. Nach Oxydation von *N*-Boc-Oxytocin¹⁰⁾ unter denselben Bedingungen enthielt das Rohprodukt nach Abspaltung der Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure oder HCl/Eisessig mindestens 40–50% monomeres Oxytocin. So muß angenommen werden, daß auch die *p*-Amino-phenylacetylgruppe einen Einfluß bei der Bildung höhermolekularen Pap-Oxytocins ausübt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden im 1-dm-Rohr im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Carl Zeiss gemessen, die Werte der D-Linie graphisch ermittelt. Für die chromatographische Reinheitsprüfung wurden die üblichen Verfahren der Papierchromatographie angewandt; Papier Nr. 2043b der Firma Schleicher & Schüll, Chromatographie 15 Stdn. aufsteigend.

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

E: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5; Oberphase).

Die Laufmittel waren mindestens 14 Tage gealtert.

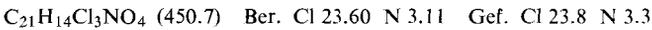
A. *N*^α-[*p*-Amino-benzoyl]-lysin-vasopressin (2)

1. *S*-Benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-phenylalanyl-*L*-glutaminyl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystein-methylester-hydrobromid (5): 15.0 g (13.5 mMol) des *Benzyl*oxycarbonyl-hexapeptid-methylesters 3⁴⁾ wurden fein gepulvert und bei Raumtemp. in 60 ccm 37.5proz. *HBr* in *Eisessig* gelöst. Nach 1 Stde. Stehenlassen bei Raumtemp. wurde durch Zugabe von 600 ccm trockenem Äther ein harziger Niederschlag gefällt, der nach Dekantieren zweimal mit je 200 ccm Äther dekantierend gewaschen und anschließend durch Verreiben mit 1 l Wasser zur Kristallisation gebracht wurde. Die überstehende Lösung stellte man mit 2 *n* Natriumcarbonat auf pH 5 ein. Nach einstdg. Stehenlassen bei 0° wurde das *Hydrobromid* abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und bei 40°/0.1 Torr über KOH getrocknet. Ausb. 11.3 g (72%). Schmp. 199–202° (Zers.).

$C_{48}H_{59}N_8O_{10}S_2]Br$ (1052.1) Ber. Br 7.60 N 10.65 1 OCH₃ 2.95

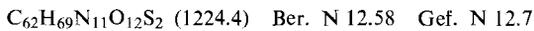
Gef. Br 7.4 N 10.6 OCH₃ 2.7

2. *p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoesäure-[2,4,5-trichlor-phenylester] (4): Zur Lösung von 27.1 g (0.1 Mol) *p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoesäure¹³⁾ in 250 ccm {trockenem Benzol wurden unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß ohne Kühlung 22 g (0.105 Mol) PCl_5 eingetragen. Das PCl_5 ging in Lösung, während *p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoylchlorid als dicker Niederschlag ausfiel, der sich bei Erwärmen auf 60° wieder löste. Man hielt 30 Min. bei 60°, destillierte dann das Lösungsmittel i. Vak. ab und destillierte zur Entfernung von $POCl_3$ zweimal i. Vak. mit je 50 ccm trockenem Toluol nach. Zur Lösung des Rückstandes in 250 ccm trockenem Tetrahydrofuran wurden 21 g (0.106 Mol) 2,4,5-Trichlor-phenol und anschließend unter Rühren langsam 25 ccm (0.315 Mol) Pyridin gegeben, wobei unter schwachem Erwärmen Pyridiniumchlorid ausfiel. Nach 1 Stde. wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der kristalline Rückstand kurz mit 300 ccm Äthanol ausgekocht, nach dem Abkühlen abfiltriert, scharf abgepreßt und schließlich aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 30.5 g (67%), Schmp. 182.5—183.5°.



3. *N*-[*p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoyl]-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-phenylalanyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystein-methylester (6): 10.5 g (10 mMol) Hexapeptid-methylester-hydrobromid 5, 6.8 g (15 mMol) 4 und 1.4 ccm (10 mMol) Triäthylamin wurden in 150 ccm Dimethylacetamid 2 Tage bei Raumtemp. gerührt. Das mit Äther ausgefällte Reaktionsprodukt wurde durch Auskochen mit Methanol gereinigt. Es war frei von Ausgangsprodukten und wurde ohne weitere Reinigung ins Hydrazid übergeführt. Ausb. 10.3 g (84%).

4. *N*-[*p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoyl]-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-phenylalanyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystein-hydrazid: Die Mischung von 10.0 g 6, 100 ccm Dimethylacetamid und 35 ccm 80proz. Hydrazinhydrat wurde 18 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Die entstandene Gallerte wurde gut mit 400 ccm Wasser durchgearbeitet, scharf abgepreßt, mit Wasser neutral gewaschen und bei 35°/15 Torr über P_2O_5 und KOH bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 7.7 g (77%). Zers.-P. 232—235°.



5. *N*-[*p*-Benzyloxycarbonylamino-benzoyl]-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-phenylalanyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-prolyl-*N*^ε-*p*-toluolsulfonyl-*L*-lysyl-glycin-amid (9): 12.3 g (10 mMol) des obenstehenden Hydrazids wurden fein gepulvert und in einer Mischung von 200 ccm Eisessig und 30 ccm 1 *n* HCl 10 Min. bei 40° gerührt. Man filtrierte dann vom Ungelösten (0.5 g) ab, kühlte das Filtrat, bis etwa ein Drittel erstarrt war, und setzte bei 0—2° portionsweise unter Rühren mit 11.0 ccm 1 *n* Natriumnitrit-Lösung. Nach 10 Min. bei 0° wurde das Azid (7) durch Zugabe von 1 *l* Eiswasser ausgefällt, über einen Büchner-Trichter abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und bei 0°/1 Torr bis zu einem Gewicht von 18—20 g getrocknet.

Das noch feuchte Azid wurde zusammen mit 6.8 g (15 mMol) *L*-Prolyl-*N*^ε-*p*-toluolsulfonyl-*L*-lysyl-glycin-amid (8)⁶⁾ in 120 ccm eiskaltem Dimethylformamid gelöst und 2 Tage bei +5° aufbewahrt. Man saugte dann von wenig Ungelöstem ab und fällte das Reaktionsprodukt mit 500 ccm Essigester aus. Es wurde mit Essigester gewaschen und bei 60° i. Vak. getrocknet; Rohausb. 10.6 g graues Pulver (64%). Zur Reinigung wurde das fein gepulverte Peptid 5 Min. mit 300 ccm Methanol ausgekocht und heiß abfiltriert. Ausb. 5.7 g (34%), $[\alpha]_D^{20}$: -51.3° (*c* = 1 in Dimethylformamid). R_F (A) nach HBr-Spaltung 0.95.



13) R. Ruggli und M. Dahn, Helv. chim. Acta 27, 1116 (1944).

Beim Stehenlassen des methanolischen Filtrats über Nacht bei $+5^{\circ}$ fielen weitere 2.2 g (13%) **9** aus. $[\alpha]_{D}^{20}$: -49.0° ($c = 1$ in Dimethylformamid), R_F (A) nach HBr-Spaltung 0.95; Gesamtausb. somit 7.9 g (48%).

6. *N*^α-[*p*-Amino-benzoyl]-lysin-vasopressin (**2**) und Lysin-vasopressin (**1**)

a) *Abspaltung der Schutzgruppen, Dehydrierung und Entsalzen des Rohproduktes*: 1.65 g (1 mMol) **9** wurden in 200 ccm über Natrium dest. flüss. Ammoniak in üblicher Weise mit Natrium bis zur 30 Sek. beständigen Blaufärbung der Lösung reduziert. Dann entfärbte man die Lösung durch Zugabe von Ammoniumchlorid, destillierte das Ammoniak im Wasserbad bei 20° ab, nahm den Rückstand in Wasser auf, stellte mit Eisessig auf pH 8.0 ein und filtrierte. Nun wurde unter Vibromischung 3 Stdn. lang CO_2 -freie Luft durch die Lösung geleitet, anschließend mit Eisessig auf pH 4 eingestellt, filtriert und lyophilisiert.

Das orangefarbene Rohprodukt wurde in 100 ccm Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert und langsam über eine Säule mit 60 ccm Ionenaustauscher Amberlite IRC-50 in der H^{\oplus} -Form gegeben. Zur Entfernung der Salze wurde mit 200 ccm 5proz. Essigsäure gewaschen, die Peptide wurden mit 200 ccm Pyridin/Eisessig/Wasser (30 : 4 : 66) eluiert. Nach Einengen des Eluats im Rotationsverdampfer bei 20° wurde der Rückstand in 200 ccm Wasser aufgenommen, filtriert und lyophilisiert. Das Lyophilisieren wurde zweimal wiederholt. Ausb. 0.95 g gelbes Pulver. Im Chromatogramm wurden zwei Hauptprodukte mit R_F (A) 0.36 und 0.58 sowie zwei Nebenprodukte mit R_F (A) 0.17 und 0.46 erkannt.

b) *Chromatographie des Rohprodukts an Carboxymethylcellulose*: Das Rohprodukt wurde in 50 ccm Wasser auf eine Säule aus 50 g Carboxymethylcellulose in der H^{\oplus} -Form gegeben. Die Elution gelang mit 1 l Ammoniumacetatlösung mit gleichmäßig ansteigendem Gradienten von 0.02–2 *m*. Man erhielt 3 gut getrennte Zonen.

I. 40 mg gelb gefärbtes Nebenprodukt mit R_F (A) 0.46.

II. 280 mg farbloses **2**, das noch wenig von Verbindung mit R_F (A) 0.36 enthielt und nach nochmaliger Chromatographie an 5 g Carboxymethylcellulose einheitlich war. R_F (A) 0.58, $[\alpha]_{D}^{20}$: -36.9° ($c = 1$ in 5proz. Essigsäure), Ausb. 160 mg.

III. 340 mg **1**, R_F (A) 0.36, $[\alpha]_{D}^{20}$: -29.3° ($c = 1$ in 5proz. Essigsäure). Die Identität mit authent. Lysin-vasopressin wurde durch Chromatographie in mehreren Laufmitteln und durch Papierelektrophorese bestätigt.

B. N-[*p*-Amino-phenylacetyl]-oxytocin (**17**)

1. *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*S*-benzyl-*L*-cystein-*p*-nitro-phenylester] (**10**)^{9, 10}) wurde in üblicher Weise¹⁴) aus 6.23 g (20 mMol) *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*S*-benzyl-*L*-cystein¹⁵⁻¹⁷), 3.34 g (24 mMol) 4-Nitro-phenol und 4.2 g Dicyclohexylcarbodiimid in 70 ccm Essigester hergestellt. Ausb. nach Umkristallisieren aus Äthanol 8.1 g (87%), Schmp. $91-92^{\circ}$, $[\alpha]_{D}^{20}$: -29.8° ($c = 2$ in Essigester).

2. *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-prolyl-*L*-leucyl-glycin-amid (**12**)¹⁰): 12.2 g (10 mMol) *N*-Benzyl-oxy-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-prolyl-*L*-leucyl-glycin-amid⁸) wurden fein gepulvert und mit 50 ccm Eisessig verrieben.

¹⁴) D. F. Elliot und D. W. Russel, Biochem. J. **66**, 49 p (1957).

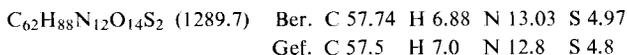
¹⁵) G. W. Anderson und A. C. McGregor, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

¹⁶) Farbwerke Hoechst AG (Erf. K. Sturm, R. Geiger und W. Siedel), Dtsch. Bundes-Pat. 1212553, C. **138**, 1767 (1967).

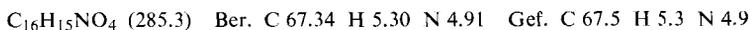
¹⁷) E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).

Nach Zugabe von 75 ccm einer 37proz. Lösung von *HBr* in Eisessig rührte man unter Feuchtigkeitsschluß 1 Stde. bei Raumtemp. und fällte dann aus der hellgelben Reaktionslösung das gebildete **11-Hydrobromid** durch Zugabe von 500 ccm absol. Äther in pulvriger Form aus. Nach Waschen mit absol. Äther würde die Verbindung einige Stdn. bei 60°/0.01 Torr über KOH getrocknet und dann in 150 ccm Dimethylformamid gelöst. In die Lösung trug man unter Rühren in kleinen Portionen stark basischen Ionenaustauscher (*Amberlite IRA-410*) ein, bis die Probe auf Brom-Ionen negativ ausfiel, filtrierte vom Austauscher ab und wusch ihn mit 100 ccm Dimethylformamid nach.

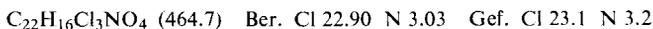
Die vereinigten Filtrate wurden mit 5.6 g (13 mMol) **10** versetzt; dann engte man unterhalb 50° i. Vak. auf etwa ein Drittel ein, fällte das Reaktionsprodukt nach zweitägigem Stehenlassen bei Raumtemp. mit 300 ccm Essigester aus und wusch das pulvrige Material auf dem Büchner-Trichter dreimal mit je 100 ccm Essigester. Ausb. 12.2 g (94.5%). Zur Reinigung wurde die Verbindung mit 200 ccm Methanol ausgekocht. Trocknung bei 60°/0.02 Torr. R_F (A) 0.93, nach Behandeln mit Trifluoressigsäure R_F (A) 0.86. Zers.-P. 220–222°, $[\alpha]_D^{20}$: -63.9° ($c = 1$ in Eisessig).



3. *p*-Benzyloxycarbonylamino-phenylelessigsäure: Zu 75.5 g (0.5 Mol) *p*-Amino-phenylelessigsäure in 500 ccm 1 *n* NaOH ließ man unter heftigem Rühren gleichzeitig 95 g (0.55 Mol) Chlorameisensäure-benzylester in 250 ccm Äther und 600 ccm 1 *n* NaOH bei +10° laufen. Danach wurde noch 1 Stde. gerührt, die noch alkalische Lösung zweimal ausgeäthert, die wäßr. Phase mit halbkonz. Salzsäure angesäuert und das ausgeschiedene Reaktionsprodukt in 1 *l* Essigester aufgenommen. Die Essigesterlösung wurde mit 1 *n* HCl und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft, der Rückstand mit Äther digeriert und aus 300 ccm 50proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 100.8 g (70.7%). Schmp. 152–153°. Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 60°/0.01 Torr getrocknet.



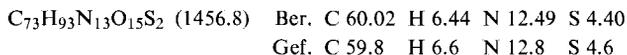
4. *p*-Benzyloxycarbonylamino-phenylelessigsäure-[2.4.5-trichlor-phenylester] (**13**): Zunächst wurde, wie unter A 2. beschrieben, aus 85.5 g *p*-Benzyloxycarbonylamino-phenylelessigsäure (0.3 Mol) und 66 g PCl_5 in 750 ccm Benzol das Säurechlorid hergestellt, das mit 63 g (0.33 Mol) 2.4.5-Trichlor-phenol in Anwesenheit von 75 ccm absol. Pyridin in 1 *l* Tetrahydrofuran in **13** übergeführt wurde. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der kristalline Rückstand mit eiskaltem Äthanol und Äther gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 94.6 g (68%), Schmp. 128–129°.



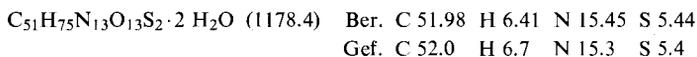
5. *N*-[*p*-Benzyloxycarbonylamino-phenylacetyl]-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminyl-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-*L*-prolyl-*L*-leucyl-glycin-amid (**15**): 2.7 g (2.09 mMol) **12** wurden in 12 ccm 90proz. Trifluoressigsäure 1 Stde. bei Raumtemp. stehen gelassen, dann mit 120 ccm Äther das von der tert.-Butyloxycarbonylgruppe befreite Nonapeptid als Trifluoressigsäure (**14**) gefällt, mit Äther gewaschen und über KOH bei 30°/0.01 Torr getrocknet. Ausb. 2.6 g (ca. 2 mMol).

Die Verbindung wurde in 25 ccm Dimethylacetamid nacheinander mit 0.06 ccm (1 mMol) Essigsäure, 0.42 ccm (3 mMol) Triäthylamin und 1.85 g (4 mMol) **13** versetzt. Die Lösung verfestigte sich innerhalb einiger Stdn. zu einer Gallerte. Nach 2 Tagen wurde unter gelegentlichem Schütteln noch 2 Stdn. auf 60° erwärmt, wieder abgekühlt, die Gallerte mit 200 ccm Äther durchgearbeitet, scharf abgepreßt und mit Äther und Essigester gewaschen. Rohausb. 3.17 g. Zur Reinigung wurde mit 35 ccm 90proz. Methanol ausgekocht und noch warm abge-

saugt. Ausb. 2.65 g (91 %). Die Verbindung war bei der chromatographischen Prüfung frei von **14**. $[\alpha]_D^{20}$: -57.7° ($c = 1$ in 95proz. Essigsäure).



6. *N*-[*p*-Amino-phenylacetyl]-oxytoecin (**16**): Die Lösung von 5.0 g (3.43 mMol) **15** in 350 ccm flüssigem Ammoniak von -40° wurde in üblicher Weise durch Natrium bis zur 30 Sek. beständigen Blaufärbung reduziert, zur Entfärbung mit Ammoniumchlorid versetzt und die Lösung im Wasserbad bei 20° eingedampft. Der Rückstand wurde in 40 ccm eiskaltem Wasser aufgenommen. Man versetzte mit Essigsäure bis pH 5, filtrierte den Niederschlag ab, wusch mit eiskaltem Wasser und trocknete über P_2O_5 und KOH im Exsiccator. Ausb. 3.1 g (88 %), R_F (A) 0.77, R_F (E) 0.49. Ein Teil der Substanz blieb am Start zurück (s. unten).

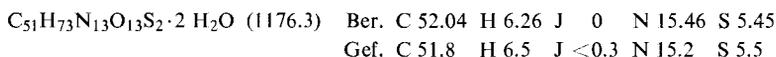


7. *N*-[*p*-Amino-phenylacetyl]-oxytocin (**17**, **18**)

a) 1.0 g (0.85 mMol) **16** wurden in 20 ccm 90proz. Essigsäure durch schwaches Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde filtriert und rasch auf Raumtemp. abgekühlt. Bei der Titration mit 0.192 *n* Jod-Lösung in Eisessig wurden 5.6 ccm verbraucht (= 1.075 mÄquivv., 63.2 %). Dann versetzte man mit 80 ccm Aceton, saugte den leicht filtrierbaren Niederschlag ab, wusch mit Aceton und Äther und trocknete im Exsiccator über H_2SO_4 und KOH. Ausb. 825 mg, R_F (A) 0.68, R_F (E) 0.20.

Die Hauptmenge blieb jedoch im Chromatogramm am Startpunkt zurück.

Zur Entfernung von Jodid wurde die Lösung des Produktes in 8 ccm 50proz. Dimethylacetamid mit 8 ccm Wasser verdünnt. Die Lösung blieb klar, doch schied sich beim Einstellen des pH auf 7.0 reichlich flockiger, leicht filtrierbarer Niederschlag ab. Man ließ 30 Min. bei 0° stehen, filtrierte den Niederschlag ab und wusch ihn mit wenig eiskaltem Wasser. Nach dem Trocknen im Exsiccator betrug die Ausb. 595 mg. Die Substanz bestand weitgehend aus der im Chromatogramm nicht wandernden Verbindung. $[\alpha]_D^{20}$: -77.9° ($c = 1$ in 90proz. Essigsäure).



b) Chromatographie an Sephadex® G-25 und G-50¹¹⁾

In ein Glasrohr von 1.5 cm Durchmesser und 86 cm genutzter Länge wurden 152 ccm gequollenes Gel von Sephadex G-25 (entsprechend 42 g Trockengewicht), in 1proz. Essigsäure suspendiert, eingefüllt. Je 10 mg der zu untersuchenden Substanz wurden in 0.5 ccm verd. Essigsäure auf die Säule aufgebracht. Zur Elution wurde 1proz. Essigsäure verwendet, eine Dosierpumpe sorgte für konstante Elutionsgeschwindigkeit (14.5 ccm/Stde.). Das Elutionsvolumen V_e wurde mit Hilfe der UV-Absorption der Verbindungen, gemessen im Uvi-Record I der Firma LKB, Stockholm, ermittelt. Das Ausschlußvolumen für größere Moleküle ($MG > 5000$) lieferte die Chromatographie von Dextranblau 2000¹¹⁾.

Die Chromatographie an Sephadex G-50 wurde in gleicher Weise in einer Säule von 1.34 cm Durchmesser und 103 cm genutzter Länge mit 145 ccm gequollenem Gel (= 17 g Trockengewicht) vorgenommen.