

Erich Wünsch und Gerhard Wendlberger

Zur Synthese des Sekretins, V¹⁾

Darstellung der Gesamtsequenz

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

(Eingegangen am 3. März 1972)

Die Synthese eines Heptacosapeptid-amids mit der von *Jorpes* und *Mutt*²⁾ für Sekretin vorgeschlagenen Sequenz

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 18 20
 Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂
 21 22 23 24 25 26 27

sowie der Teilsequenz 7—27 des Hormons wird beschrieben.

The Synthesis of Secretin, V¹⁾

Preparation of the complete sequence 1—27

The synthesis of a heptacosapeptideamide containing the amino acid sequence

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂
 21 22 23 24 25 26 27

as it had been proposed for secretin by *Jorpes* and *Mutt*, is described as well as the preparation of the partial sequence 7—27 of the hormone.

In vier vorausgegangenen Mitteilungen^{3,4,5,1)} haben wir die Darstellung der geschützten Sequenzen 18—27, 12—27 sowie 7—11 und 1—6 des Sekretins beschrieben. Über die Synthese der Gesamtsequenz des Hormons aus den drei letztgenannten Fragmenten soll die vorliegende Arbeit Auskunft geben:

In unserer „Vorsynthese“⁶⁾ hatten wir die beiden Fragmente H-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ [12-27b] und NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH [7-11a] nach dem Wünsch-Weygandschen Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren

¹⁾ IV. Mittell.: E. Wünsch, G. Wendlberger und R. Spangenberg, Chem. Ber. 104, 3854 (1971).

²⁾ V. Mutt und E. Jorpes, Recent Progr. Hormone Res. 23, 483 (1967).

³⁾ E. Wünsch, G. Wendlberger und A. Högel, Chem. Ber. 104, 2430 (1971).

⁴⁾ E. Wünsch, G. Wendlberger und P. Thamm, Chem. Ber. 104, 2445 (1971).

⁵⁾ E. Wünsch und P. Thamm, Chem. Ber. 104, 2454 (1971).

⁶⁾ G. Wendlberger, A. Högel, P. Thamm, R. Spangenberg und E. Wünsch, Peptides 1971, Proc. XIth Europ. Peptide Symposium, Vienna 1971, North-Holland Publ. Co., im Druck.

ren^{7,8)} vereinigt; dank seiner Schwerlöslichkeit einerseits in heißem Essigester andererseits in Wasser ließ sich das gebildete NPS-Unicosapeptid-amid [7-27a] von den nicht umgesetzten Startmaterialien, dem NPS-Pentapeptid [7-11a] bzw. dem Hexadecapeptid-amid [12-27b] befreien. Folgende Desulfenylierung von 7-27a unter Einwirkung von zwei Äquivalenten 0.1 *n* HBr in Methanol/Dimethylformamid (1:1) unter Zusatz von 2-Methyl-indol führte zum H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ [7-27c], isoliert in Form des Hydrobromids mit fast 80proz. Ausbeute über beide Stufen. Die vorgenommenen Reinheitsteste incl. der elementaranalytischen Daten fielen erfolgversprechend aus. Lediglich die Argininwerte der Aminosäureanalyse waren zu niedrig; die fehlende äquivalente Menge wurde — entgegen unseren bisherigen Erfahrungen — als Ornithin erfaßt.

Unsere Reindarstellungsversuche an dem „Roh-Sekretin der Vorsynthese“⁹⁾ deckten u. a. das Vorhandensein von Fehlsequenzen auf, die nur die Folge „unsauberer“ Fragmentkondensationen im Zuge der Erstellung der Gesamtsequenz sein konnten*). Aus den gewonnenen Erkenntnissen heraus haben wir daher in unserer vorliegenden Synthese die vorstehende Fragmentkondensation zunächst nicht mehr mit NPS-, sondern mit Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH [7-11b] ausgeführt:

Sowohl nach den bekannten Kombinationsverfahren als auch nach den modifizierten Bedingungen von Geiger¹⁰⁾ gelang es, das Z-Unicosapeptid-amid-Derivat [7-27b] — unter einer analogen Aufarbeitungstechnik wie für das NPS-Derivat — in 90proz. Ausbeute chromatographisch und analytisch rein zu isolieren. Hydrogenolytische Entfernung der *N*-Schutzgruppe von 7-27b in 80proz. Essigsäure und anschließende Titration der freigewordenen Aminofunktion mit 0.1 *n* HBr führte fast quantitativ zum Unicosapeptid-amid-Derivat [7-27c], isoliert in Form des Hydrobromids. Für dieses Produkt erbrachte die vorgenommene Aminosäureanalyse einwandfreie Arginin-Werte. Unsere gesammelten Erfahrungen ließen letztlich auch eine „Neuaufgabe“ der Fragmentkondensation mit der NPS-Verbindung [7-11a] als Kopfkomponeute mit Erfolg zu: Das nunmehr gewonnene Unicosapeptid-amid-Derivat [7-27c] war dem vorstehend beschriebenen in den Reinheitskriterien fast ebenbürtig; lediglich etwas niedrige Argininwerte (3.76 : 4) der Aminosäureanalyse — bei Ornithinwerten unter 2% — trüben das sonst sehr gute Ergebnis ein wenig.

Letzter Abschnitt unserer Sekretin-Synthese war die Vereinigung des gewonnenen Peptid-Teilstücks [7-27c] mit dem aminoendständigen Fragment AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH [1-6] unter bekannter Verknüpfungstechnik¹¹⁾. Im Zuge der Aufarbeitungsoperation gelang es, die in heißem Essigester gut lösliche überschüssige bzw. nicht umgesetzte Kopfkomponeute [1-6] abzutrennen; dagegen bereitete die Entfernung nicht umgesetzter Aminokomponeute [7-27c] infolge ihrer dem Verknüpfungsprodukt sehr ähnlichen Löslichkeitseigenschaften erhebliche

*) Vgl. dazu auch unsere IV. Mitteil.¹¹⁾

⁷⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **99**, 110 (1966).

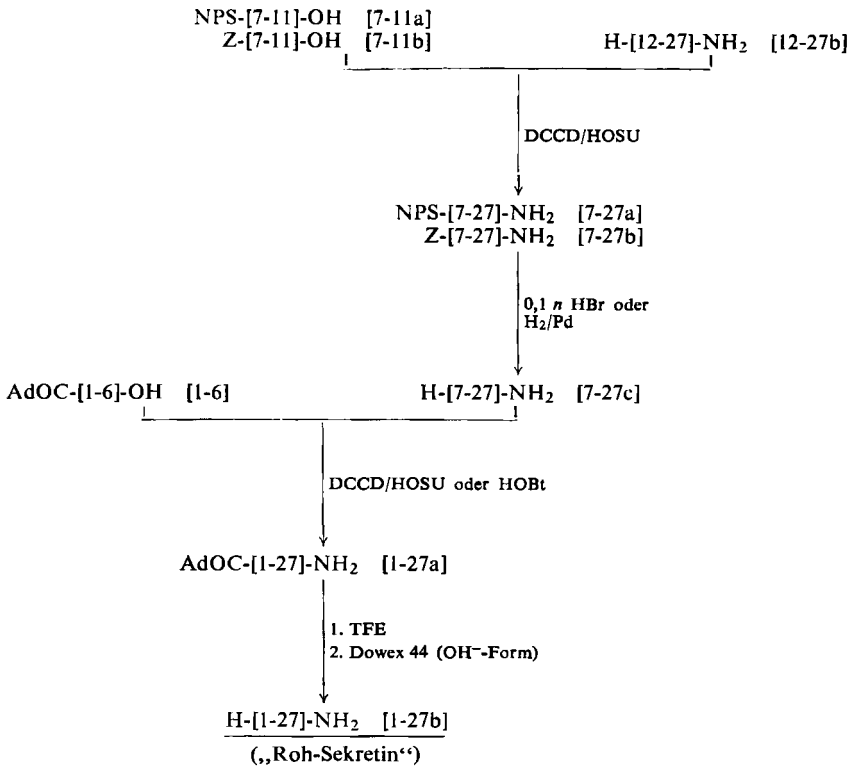
⁸⁾ F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21b**, 426 (1966).

⁹⁾ E. Jaeger, M. Deffner, K.-H. Deimer, R. Scharf und E. Wünsch, Peptides 1971, Proc. XIth Europ. Peptide Symposium, Vienna 1971, North-Holland Publ. Co., im Druck.

¹⁰⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

¹¹⁾ E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. **101**, 3659 (1968).

Schwierigkeiten: In Auswertung der Aminosäureanalyse schien etwa eine 90proz. Verknüpfung erreicht worden zu sein. Da wir das Ergebnis dieser Synthese-Stufe bislang nicht verbessern konnten, haben wir unsere Arbeit mit dem vorliegenden Rohprodukt — wie aus der nachfolgenden Veröffentlichung ersichtlich, mit Erfolg — fortgesetzt und die erforderliche Abspaltung der Schutzgruppen von AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ [1-27a] wie üblich¹¹⁾ mittels wasserfreier Trifluoressigsäure vollzogen. Über die Reinigung des in lyophilisierter Form gewonnenen „Roh-Sekretins“ [1-27b] soll die nachfolgende VI. Mitteil.¹²⁾ Aufschluß geben.



Synthese der Gesamtsequenz des Sekretins

Die bisher nicht gelungene Darstellung einer chromatographisch und analytisch reinen, allseits geschützten Gesamtsequenz des Sekretins [= 1-27a] hat uns bewogen, das synthetisierte Peptid-Teilstück [7-27c] durch Trifluoressigsäure-Demaskierung in das freie Unicosapeptid-amid [7-27d] überzuführen. Übliche Aufarbeitung (incl. Gefriertrocknung) erbrachte chromatographisch und analytisch reines H-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

¹²⁾ E. Wünsch, E. Jaeger, M. Deffner, R. Scharf und P. Lehnert, Chem. Ber. **105**, 2515 (1972), nachstehend.

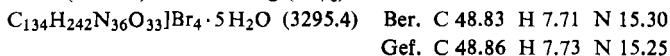
[7-27d], isoliert in fester lyophilisierter Form, der Bruttozusammensetzung nach, mit 8 Mol Essigsäure und 14 Mol Wasser. Die geglückte Reindarstellung dieses Unicosapeptid-amids [7-27d] stützt zusätzlich unsere oben getroffene Feststellung einer einwandfrei vollzogenen Fragmentkondensation unter Benutzung des Z-Pentapeptids [7-11b] als Kopfkomponente; daraus folgt zwangsläufig, daß letztlich das Peptid-Teilstück [7-27c] als qualifiziertes Startmaterial für den letzten Syntheseabschnitt zur Verfügung stand.

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir wiederum für umfangreiche finanzielle Unterstützung zu höchstem Dank verpflichtet; der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* danken wir für eine Sachbeihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“. Unseren technischen Assistenten, Herrn *J. Musiol* (präparative Arbeiten) und Fräulein *R. Scharf* (analytische Arbeiten) danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leitung *W. Beck*) ausgeführt.

Beschreibung der Versuche

Die spezif. Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss ermittelt, die Werte der D-Linie berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach den üblichen Verfahren der Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen. Die Ausführung der Aminosäureanalyse geschah nach der Methode von *Stein und Moore* (Beckman 120 B mit Digital-Integrator).

1. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyll-glycyl-L-leucyl-L-valinamid* [7-27b]: 2.7 g *Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH* [7-11b]⁵⁾ und 2.5 g *H-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [12-27b·HBr]⁴⁾ in 200 cm Dimethylformamid/Dimethylacetamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid (4 : 2 : 1) werden bei Raumtemperatur tropfenweise mit 0.14 ccm Triäthylamin und anschließend mit 0.46 g *N-Hydroxy-succinimid* (oder 0.54 g *1-Hydroxy-benzotriazol*), nach Abkühlen auf -10° schließlich mit 0.62 g *Dicyclohexylcarbodiimid* unter Rühren versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 72 Stdn. bei 0° und nach nochmaligem Zusatz von 0.9 g [7-11b] sowie 0.115 g *N-Hydroxy-succinimid* (oder 0.135 g *N-Hydroxy-benzotriazol*) und 0.206 g *Dicyclohexylcarbodiimid* weitere 40 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, anschließend 30 Min. auf $50-60^{\circ}$ erwärmt. Dimethylformamid und Dimethylacetamid werden i. Vak. abgedampft, die verbleibende Lösung wird in 1800 ccm heißen Essigester eingerührt. Der nach Stehenlassen über Nacht ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, mehrere Male mit heißem Essigester gewaschen und letztlich sorgfältig mit warmem Wasser unter Zuhilfenahme einer Zentrifuge digeriert. Die letzte Operation wird wiederholt. Das erhaltene Material wird mit wenig Methanol behandelt, die geleeartige, aber noch flüssige Masse wiederum in heißen Essigester eingerührt. Das abgesetzte Produkt wird auf das Filter gebracht, mit Essigester und Diäthyläther sorgfältig gewaschen und schließlich bei 10^{-2} Torr/ 60° getrocknet: $[\alpha]_D^{20}$: $-22.1 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{346}^{20}$: -27.6° ($c = 1$ in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20) und in n-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 2.95 g (90%).



Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	4.00	1.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	6.00
Gef.	3.97	0.99	1.00	2.98	3.00	1.00	1.01	0.99	6.00

2. 2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-leucyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid [7-27a]

2.5 g *H*-Arg(*HBr*)-*Leu*-Arg(*HBr*)-Asp(*OBu*)-Ser(*tBu*)-Ala-Arg(*HBr*)-*Leu*-Gln-Arg(*HBr*)-*Leu*-*Leu*-Gln-Gly-*Leu*-Val-NH₂·*HBr* [12-27b·*HBr*] und 1.4 g *NPS*-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(*OBu*)-*Leu*-Ser(*tBu*)-OH [7-11a]⁴⁾ werden in 210 ccm Dimethylformamid/Dimethylacetamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid (4 : 2 : 1) unter Erwärmen und Rühren gelöst. Die auf -10° abgekühlte Lösung wird mit 0.14 ccm Triäthylamin, 0.33 g *N*-Hydroxy-succinimid und 0.412 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt; das Reaktionsgemisch wird 12 Stdn. bei -5° und 60 Stdn. bei Raumtemperatur unter Magnetührung gehalten, nach Zugabe von weiteren 0.91 g [7-11a], 0.115 g *N*-Hydroxy-succinimid sowie 0.206 g Dicyclohexylcarbodiimid zusätzliche 48 Stdn. Dimethylformamid und -acetamid werden unter Vak.-Destillation bei 10⁻² Torr der Mischung entzogen; beim Einrühren der Restlösung in 2500 ccm heißen Essigester tritt Fällung ein. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit warmem Wasser unter Zuhilfenahme einer Zentrifuge digeriert. Nach Wiederholung des letzten Arbeitsganges und nach Trocknen des isolierten Produkts bei 10⁻² Torr/60°: chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20) und in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 2.65 g (82%).

C ₁₃₂ H ₂₃₉ N ₃₇ O ₃₃]Br ₄ ·2H ₂ O (3260.4)	Ber.	C 48.63	H 7.51	N 15.90	S 0.98	Br 9.80
	Gef.	C 48.56	H 7.59	N 15.69	S 1.14	Br 9.52

Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	4.00	1.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	6.00
Gef.	3.93	0.97	0.98	3.05	3.08	1.01	1.00	0.98	6.05

3. *O*-*tert*-Butyl-*L*-threonyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-leucyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid-hydrobromid [7-27c·*HBr*]

a) 2.6 g *Z*-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(*OBu*)-*Leu*-Ser(*tBu*)-Arg(*HBr*)-*Leu*-Arg(*HBr*)-Asp(*OBu*)-Ser(*tBu*)-Ala-Arg(*HBr*)-*Leu*-Gln-Arg(*HBr*)-*Leu*-*Leu*-Gln-Gly-*Leu*-Val-NH₂ [7-27b] in 700 ccm 80proz. Essigsäure werden wie üblich hydrogenolytisch (Pd-Schwarz) entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator wird i. Vak. eingedampft, die wäßrige Lösung des Rückstands nach Titration mit 0.1 *n* *HBr* (Verbrauch 8.13 ccm) erneut i. Vak. zur Trockene gebracht. Aus Methanol/Essigester farblose amorphe Substanz, $[\alpha]_D^{20}$: -26.8 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{440}^{20}$: -32.8° (*c* = 1 in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1) und in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20). Ausb. 2.5 g (97%).

C ₁₂₆ H ₂₃₇ N ₃₆ O ₃₁]Br ₅ ·4H ₂ O (3224.2)	Ber.	C 46.94	H 7.66	N 15.64
	Gef.	C 46.73	H 7.62	N 15.55

Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	4.00	1.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	6.00
Gef.	3.98	0.99	0.94	3.01	3.05	1.00	1.00	0.99	5.99

b) 2.35 g *NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂* [7-27a] werden in 400 ccm Methanol/Dimethylformamid (1:1) unter Zusatz von 9 g 2-Methyl-indol gelöst. Zu der Mischung läßt man unter Rühren und Eiskühlung innerhalb von 2 Stdn. 15 ccm 0.1 *n* methanol. *HBr* zutropfen. Nach 4stdg. Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch i. Vak. auf 200 ccm eingengt, die Restlösung anschließend in 500 ccm Äther eingerührt. Der gebildete Niederschlag wird nach mehrstg. Stehenlassen in der Kälte abfiltriert. Nach Umfällen aus Dimethylacetamid/Äther farblose, amorphe Substanz (nach Trocknen bei 10⁻³ Torr/80° über P₂O₅) von $[\alpha]_D^{20}$: $-28.2 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -34.2° ($c = 2$ in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) und in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 2.25 g (95%).

C₁₂₆H₂₃₇N₃₆O₃₁·Br₅·2 H₂O (3188.2) Ber. C 47.46 H 7.61 N 15.82 Br 12.53
Gef. C 47.38 H 7.73 N 15.52 Br 12.55

Aminosäureanalyse: Arg Orn Asp Thr Ser Glu Gly Ala Val Leu
Ber. 4.00 0 1.00 1.00 3.00 3.00 1.00 1.00 1.00 6.00
Gef. 3.76 0.02 0.96 1.04 2.97 3.06 1.01 0.97 0.98 5.98

4. *L-Threonyl-L-seryl-L-glutamyl-L-leucyl-L-seryl-L-arginyl-L-leucyl-L-arginyl-L-asparagyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutamyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [7-27d]: 0.25 g *H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [7-27c·HBr] werden mit 10 ccm wasserfreier, eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und 2½ Stdn. sich selbst überlassen; hierbei erfolgt Lösung. Danach wird überschüss. *Trifluoressigsäure* bei 10⁻² Torr entfernt, der verbleibende Rückstand mit einer wäbr. Suspension von Dowex 44 (OH-Form) behandelt. Das Filtrat vom Austauscher wird letztlich gefriergetrocknet: chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 0.170 g (86%).

C₁₀₂H₁₈₄N₃₆]·8 CH₃CO₂H·14 H₂O (3143.5) Ber. C 45.05 H 7.89 N 16.04 O 31.05
Gef. C 45.11 H 7.91 N 16.22 O 31.61

Aminosäureanalyse: Arg Asp Thr Ser Glu Gly Ala Val Leu
Ber. 4.00 1.00 1.00 3.00 3.00 1.00 1.00 1.00 6.00
Gef. 3.95 1.00 0.94 2.92 2.99 1.04 1.01 0.97 6.05

5. *N^α.N^{im}-Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-glycyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutamyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [1-27a]: 4.5 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH* [1-6]⁵ und 4 g *H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [7-27c·HBr] in 280 ccm Dimethylformamid/Dimethylacetamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid (1:4:2) werden bei -10° mit 0.175 ccm Triäthylamin, 0.575 g *N-Hydroxy-succinimid* (oder 0.675 g *1-Hydroxy-benzotriazol*) und 0.775 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Man rührt die Reaktionsmischung 48 Stdn. bei 4°, nach nochmaligem Zusatz von 1.5 g [1-6], 0.145 g *N-Hydroxy-succinimid* (oder 0.170 g *1-Hydroxy-benzotriazol*) und 0.254 g *Dicyclohexylcarbodiimid* 60 Stdn. bei Raumtemperatur und läßt schließlich nach Einengen i. Vak. auf 80 ccm, unter Rühren in 3000 ccm heißen Essigestern einfließen. Am anderen Morgen wird der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, sorgfältig mit heißem Essig-

ester gewaschen und mit Wasser/Methanol (3:1) mehrfach — unter Zuhilfenahme einer Zentrifuge — digeriert. Das erhaltene Material wird bei 10^{-2} Torr/65° getrocknet. Ausb. 4.5 g.

Aminosäureanalyse:	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Phe
Ber.	1.00	4.00	2.00	2.00	4.00	3.00	2.00	1.00	1.00	6.00	1.00
Gef.	0.91	3.95	1.91	1.88	4.01	3.01	1.92	1.00	0.97	6.04	0.90

6. *L-Histidyl-L-seryl-L-asparagyl-glycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-glutamyl-L-leucyl-L-seryl-L-arginyl-L-leucyl-L-arginyl-L-asparagyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutamyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [1-27b]: 0.6 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂* [1-27a] werden mit 20 ccm wasserfreier, eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen; die nach kurzer Zeit klar erhaltene Lösung hält man unter Rühren 2½ Stdn. bei Raumtemperatur. Anschließend wird überschüss. *Trifluoressigsäure* i. Vak. bei maximal 20° Badtemperatur entfernt. Der verbleibende Rückstand wird sorgfältig mit einer Aufschlammung von Dowex 44 (OH-Form) in Wasser behandelt, das Filtrat vom Austauscherharz nach Ansäuern mit Essigsäure gefriergetrocknet. Ausb. 0.48 g.

Aminosäureanalyse:	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Phe
Ber.	1.00	4.00	2.00	2.00	4.00	3.00	2.00	1.00	1.00	6.00	1.00
Gef.	0.90	3.96	1.92	1.89	4.02	3.02	1.92	1.00	0.98	6.05	0.91

[70/72]