

Wolfgang König und Rolf Geiger

Pyroglutamylpeptide

Aus den Farbwerken Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning
Frankfurt/Main-Höchst

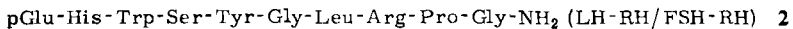
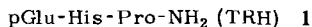
(Eingegangen am 25. April 1972)

N^α -Benzyloxycarbonyl- N^γ -[4,4'-dimethoxy-benzhydryl]-glutaminylopeptide eignen sich wegen ihrer vorteilhaften Eigenschaften vorzüglich als Ausgangsprodukte für Pyroglutamylpeptide. Durch Erhitzen in Trifluoressigsäure/Anisol werden sowohl die Schutzgruppen abgespalten als auch der Pyroglutamytring geschlossen. Das Verfahren eignet sich unter anderem zur Synthese des Thyreotropin-Releasinghormons (TRH).

Pyroglutamylpeptides

N^α -Benzyloxycarbonyl- N^γ -[4,4'-dimethoxybenzhydryl]-glutaminylopeptides are very suitable intermediates for pyroglutamylpeptide synthesis. By heating with trifluoroacetic acid/anisole the protecting groups are split off with simultaneous cyclisation to the pyroglutamylpeptides. This procedure is very useful for the synthesis of thyreotropin releasing hormone (TRH).

Aminoendständige Pyroglutaminsäure findet man in natürlich vorkommenden Peptiden recht häufig. Bekannte Beispiele sind u. a. Gastrin, Eledoisin und Physalamin. Im Verlauf der Arbeiten über die Hypothalamus-Releasinghormone wurde erst vor kurzem die Struktur des Thyreotropin-Releasinghormons (TRH) (1)¹⁻⁴ und des Releasinghormons, das sowohl luteinisierendes wie auch follikelstimulierendes Hormon freisetzt (LH-RH/FSH-RH) (2)^{5,6}, aufgeklärt.



Die Aminosäuresequenz beider Hormone beginnt mit Pyroglutamyl-histidin.

Bei den zahlreichen TRH-Synthesen, die bisher beschrieben wurden, hat man nahezu alle geläufigen Methoden zur Herstellung von Pyroglutamylpeptiden herangezogen. So wurde z. B. TRH erstmals durch Veresterung von H-Glu-His-Pro-OH mit methanolischer Salzsäure

- 1) K. Folkers, F. Enzmann, J. Böler, C. Y. Bowers und A. V. Schally, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **37**, 123 (1969).
- 2) R. M. G. Nair, J. F. Barrett, C. Y. Bowers und A. V. Schally, *Biochemistry* **9**, 1103 (1970).
- 3) C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Böler und K. Folkers, *Endocrinology* **86**, 1143 (1970).
- 4) R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio und R. Guillemin, *C. R. Acad. Sci, Ser. D* **269**, 1870 (1969).
- 5) H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura und A. V. Schally, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **43**, 1334 (1971).
- 6) Y. Baba, H. Matsuo und A. V. Schally, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **44**, 459 (1971).

und anschließende Umsetzung mit Ammoniak hergestellt^{1,7)}, ferner wurde Pyroglutaminsäure mittels Dicyclohexylcarbodiimid, als gemischtes Anhydrid oder Aktivester mit Histidylprolin-Sequenzen, verknüpft, wobei das Prolin meist mit einem polymeren Träger verestert war⁸⁻¹⁰⁾. Weitere Synthesen verwendeten Benzyloxycarbonylpyroglutaminsäure, die einmal mit H-His(Bzl)-Pro-NH₂¹¹⁾ und das andere Mal mit Histidinmethylester^{12,13)} umgesetzt wurde. Auch die Möglichkeit der Umwandlung von Glutaminyl- in Pyroglutamylpeptide durch Erhitzen der Glutaminylpeptide in wäßrigen Lösungsmitteln^{14,15)} wurde herangezogen¹⁶⁻¹⁸⁾.

Abgesehen von der Festkörpermethode, die andere Probleme mit sich bringt, verlaufen alle diese Synthesen von TRH über meist wasserlösliche und schlecht kristallisierende, amorphe Zwischenprodukte.

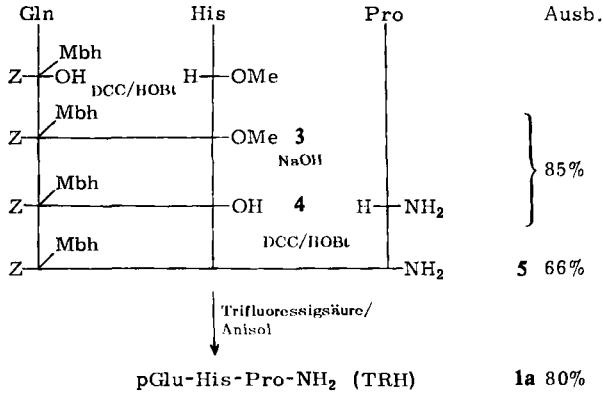
Nun fanden wir im Rahmen unserer Untersuchungen über Amidschutzgruppen bei der dünn-schichtchromatographischen Überprüfung der Abspaltung des 4,4'-Dimethoxy-benzhydrylrestes von *N*^γ-[4,4'-Dimethoxy-benzhydryl]-glutamin¹⁹⁾ mit siedender Trifluoressigsäure, daß das zunächst entstehende Glutamin bei fortschreitender Reaktionsdauer nach etwa 30 Min. zugunsten einer neuen ninhydrin-negativen Verbindung verschwunden war. Diese neu entstandene Verbindung konnten wir als Pyroglutaminsäure identifizieren. Da die *N*^γ-[4,4'-Dimethoxy-benzhydryl]-glutamin enthaltenden Peptide meist sehr gut kristallisieren und durch den lipophilen 4,4'-Dimethoxy-benzhydrylrest die Wasserlöslichkeit stark gesenkt wird, boten sich ganz allgemein für die Herstellung von Pyroglutamylpeptiden und speziell für die Synthese von TRH leicht zu reinigende, meist kristalline Zwischenprodukte an.

Bei der Synthese von TRH beschränkten wir vier verschiedene Wege. Unser Ziel war die Synthese von Glutaminyl-histidyl-prolinamid-Sequenzen, bei denen die beiden oder nur eine der zwei Amidgruppen mit dem 4,4'-Dimethoxy-benzhydrylrest geschützt und die Aminogruppe mit dem Benzyloxycarbonylrest blockiert sein sollten. Da bekanntlich der Benzyloxycarbonylrest²⁰⁾ wie auch der 4,4'-Dimethoxy-benzhydryl-

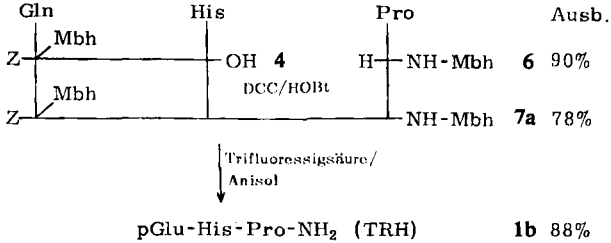
-
- ⁷⁾ F. Enzmann, J. Bøler, K. Folkers, C. Y. Bowers und A. V. Schally, *J. med. Chem.* **14**, 469 (1971).
- ⁸⁾ C. M. Baugh, C. L. Krumdieck, J. M. Hershman und J. A. Pittman jr., *Endocrinology* **87**, 1015 (1970).
- ⁹⁾ G. Flouret, *J. med. Chem.* **13**, 843 (1970).
- ¹⁰⁾ H. C. Beyerman, P. Kranenburg und J. L. M. Syrier, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **90**, 791 (1971).
- ¹¹⁾ J. K. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B. Currie, K. Folkers und G. D. Daves, *J. med. Chem.* **14**, 481 (1971).
- ¹²⁾ J. Bøler, J. K. Chang, F. Enzmann und K. Folkers, *J. med. Chem.* **14**, 475 (1971).
- ¹³⁾ D. Gillessen, A. M. Felix, W. Lergier und R. O. Studer, *Helv. chim. Acta* **53**, 63 (1970).
- ¹⁴⁾ F. Chillemi, L. Bernardi und G. Bosisio, *Gazz. chim. ital.* **94**, 891 (1964).
- ¹⁵⁾ J. Rudinger und Z. Pravda, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **23**, 1947 (1958).
- ¹⁶⁾ K. Folkers, J.-K. Chang und B. L. Currie, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **39**, 110 (1970).
- ¹⁷⁾ P. Rivaille und G. Milhaud, *Helv. chim. Acta* **54**, 355 (1971).
- ¹⁸⁾ K. Inouye, K. Namba und H. Otsuka, *Bull. chem. Soc. Japan* **44**, 1689 (1971).
- ¹⁹⁾ W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 2041 (1970).
- ²⁰⁾ F. Weygand und W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **14b**, 472 (1959).

rest¹⁹⁾ mit Trifluoressigsäure/Anisol abspaltbar sind und Glutamin, wie wir sahen, in heißer Trifluoressigsäure in Pyroglutaminsäure umgewandelt wird, sollte aus den oben beschriebenen Derivaten durch Kochen in Trifluoressigsäure/Anisol in einem Schritt TRH entstehen.

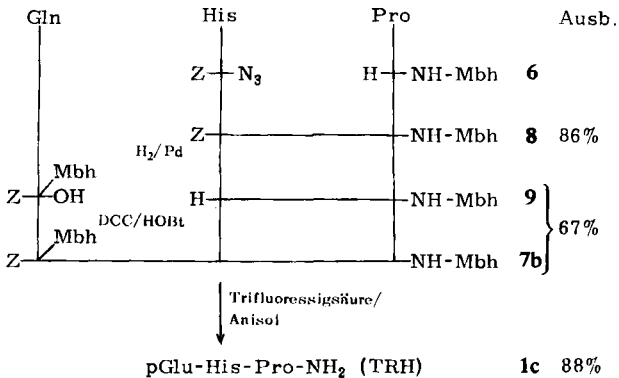
Syntheschema 1: Herstellung von TRH



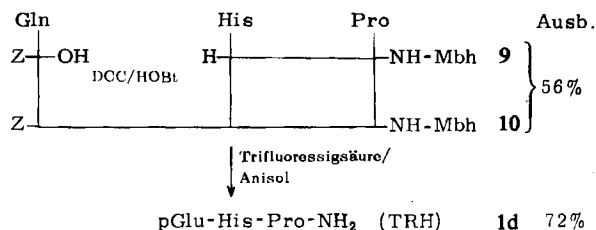
Syntheschema 2: Herstellung von TRH



Syntheschema 3: Herstellung von TRH

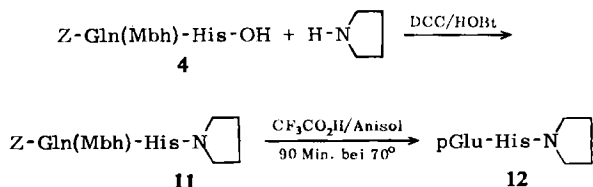


Syntheschema 4: Herstellung von TRH



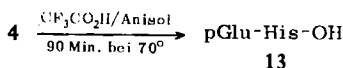
Wie die Reaktionsschemata zeigten, wurde zur Peptidknüpfung in einem Fall die Azidmethode²¹⁾ verwendet, während bei allen übrigen Peptidknüpfungen die Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazol-Methode (DCC/HOBT)²²⁾ angewandt wurde. Ist das geschützte Tripeptid einheitlich, so fällt das nach der Trifluoressigsäure/Anisol-Behandlung entstandene TRH so rein an, daß sich eine weitere Reinigung erübrigt.

Um den Beitrag der Carbonamidgruppe des Prolinamids zur TRH-Wirkung zu prüfen, wurde Prolinamid gegen Pyrrolidin ausgetauscht und damit ein Des-carbamoyl-TRH (12) hergestellt. Die Synthese verlief analog Schema 1:



12 zeigte noch beträchtliche TRH-Wirkung. Die Carbonamidgruppe des TRH ist somit für die biologische Wirkung nicht essentiell.

Bei der Synthese von LH-RH/FSH-RH²³⁾ (2) setzten wir Pyroglutamyl-histidin (13) ein, da bei der sauren Abspaltung des 4,4'-Dimethoxy-benzhydryl- und des Benzyloxycarbonylrestes eine Schädigung des Tryptophans zu befürchten war²⁴⁾. 13 stellten wir analog TRH aus 4 durch Trifluoressigsäure/Anisol-Behandlung her. Die Ausbeute ist hier wesentlich höher als z.B. bei der Verseifung des Pyroglutamyl-histiden-methylesters, bei der das Pyroglutamyl-histidin als Dicyclohexylaminsalz isoliert wurde¹²⁾.



Die Umwandlung von Glutaminyl- in Pyroglutamylpeptide mittels Kochen in Trifluoressigsäure ist aber nicht auf Pyroglutamyl-histidin-Sequenzen beschränkt,

21) Th. Curtius, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

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

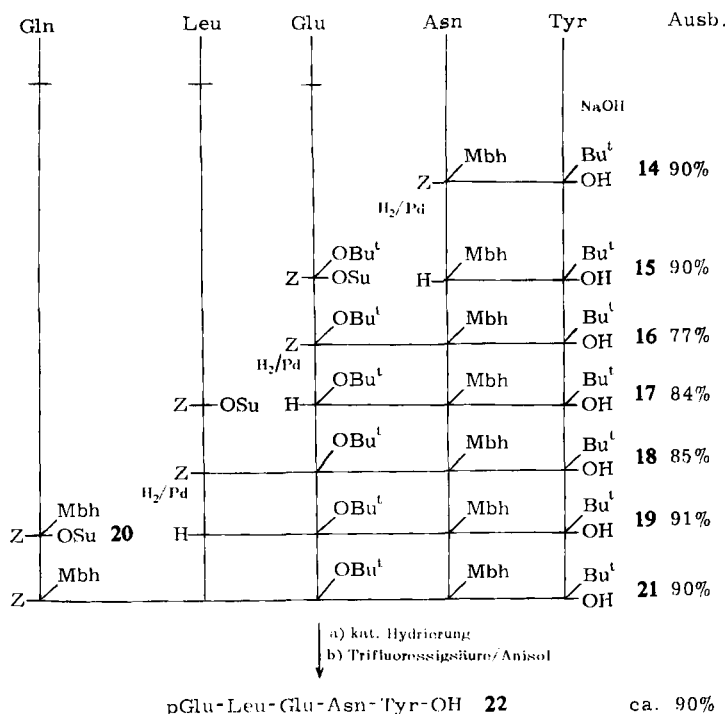
23) R. Geiger, W. König, H. Wissmann, K. Geisen und F. Enzmann, Biochem. biophysic. Res. Commun. **45**, 767 (1971).

24) R. A. Boissonnas, S. Guttman, R. L. Huguenin, P.-A. Jaquenoud und E. Sandrin, Helv. chim. Acta **41**, 1867 (1958).

sondern dürfte allgemein anwendbar sein. So konnten wir z. B. nach diesem Verfahren Z-Gln(Mbh)-Leu-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH, eine Sequenz aus der Insulin-A-Kette, glatt in pGlu-Leu-Glu-Asn-Tyr-OH umwandeln (s. Schema 5).

Hier wurde der Benzoyloxycarbonylrest vor der Trifluoressigsäure/Anisol-Behandlung katalytisch abhydriert. Diese Maßnahme empfiehlt sich vor allem bei empfindlicheren Sequenzen, da jetzt nur noch maximal 30 Min. mit Trifluoressigsäure/Anisol erhitzt werden muß, um den Pyroglutamylring zu bilden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist sonst die Abspaltung des Benzoyloxycarbonylrestes.

Syntheschema 5:



Wir danken Frau Dr. E. Azadian/Roussel-Uclaf für die Bestimmung der TRH-Wirkung und Herrn P. Pokorny für die wertvolle experimentelle Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden in einem 1-dm-Rohr im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Perkin-Elmer gemessen. Die chromatographische Reinheit wurde auf Dünnschichtplatten (Kieselgel F-254) der Fa. Merck in verschiedenen Laufmitteln geprüft.

Abkürzungen: Z = Benzoyloxycarbonyl, OMe = Methyl ester, OBu^t = tert.-Butylester, OSu = N-Hydroxy-succinimidester, Bu^t = tert.-Butyl, Mbh = 4,4'-Dimethoxy-benzhydryl, pGlu = Pyroglutaminsäure.

Beispiel 1: Synthese von „TRH“ (nach Syntheschema 1)

a) *Z-Gln(Mbh)-His-OMe* (3): 456 g (0.9 Mol) *Z-Gln(Mbh)-OH*¹⁹⁾, 242 g (1 Mol) *H-His-OMe* · 2 HCl²⁵⁾ und 270 g (2 Mol) 1-Hydroxy-benzotriazol werden in 3 l Dimethylformamid verrührt. Dazu gibt man 260 ccm (2 Mol) *N*-Äthyl-morpholin und bei 0° eine kalte Lösung von 220 g (ca. 1 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in wenig Dimethylformamid. Man rührt 1 Stde. bei 0°, 2 Stdn. bei Raumtemp. und läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen. Anderntags wird der Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) abgesaugt und das Filtrat mit etwa 3 kg Eis und anschließend mit etwa 10–20 l Wasser versetzt. Mit einer gesättigten KHCO₃-Lösung wird pH 8 eingestellt. Man rührt gut durch und läßt 1 Stde. bei 0° stehen. Nun wird abgesaugt und mit Wasser gut gewaschen. Bei 40° wird im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

Die Substanz trocknet nur sehr langsam und wurde daher noch in feuchtem Zustand verseift. Eine kleine Probe wurde getrocknet und aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 204–207°, $[\alpha]_D$: -0.3° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

C₃₅H₃₉N₅O₈ (657.7) Ber. C 63.90 H 5.98 N 10.65 Gef. C 64.1 H 6.0 N 10.8

b) *Z-Gln(Mbh)-His-OH* (4): Die oben gewonnene, noch etwas feuchte Substanz wird in etwa 5 l Dioxan/Wasser (80:20) suspendiert und mit Thymolphthalein versetzt. Nun gibt man so lange 1 n NaOH zu, bis sich die blaue Reaktionslösung nicht mehr entfärbt (theoret. Verbrauch etwa 930 ccm). Nach beendeter Reaktion wird von noch ungelöstem Material (in der Hauptsache Dicyclohexylharnstoff) abgesaugt und das Filtrat mit der gleichen Menge 1 n HCl versetzt, wie 1 n NaOH verbraucht worden war. Die resultierende Lösung wird eingengt und der Rückstand mit Wasser verrieben. Die Substanz wird abgesaugt und getrocknet. Zur Reinigung wird die feinerriebene Substanz mit Tetrahydrofuran aufgeköcht und heiß abgesaugt, mit heißem Tetrahydrofuran nachgewaschen und getrocknet. Ausb. 495 g (85%, bez. auf *Z-Gln(Mbh)-OH*). Schmp. 183–188°, $[\alpha]_D^{20}$: $+4.2^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid).

C₃₄H₃₇N₅O₈ (643.7) Ber. C 63.44 H 5.80 N 10.88

C₃₄H₃₇N₅O₈ · 1/2 H₂O (652.7) Ber. C 62.57 H 5.87 N 10.74
Gef. C 62.2 H 6.1 N 10.2

c) *Z-Gln(Mbh)-His-Pro-NH₂* (5): Zu einer Lösung von 96.5 g 4 in 1 l Dimethylformamid gibt man 22.6 g *H-Pro-NH₂* · HCl²⁶⁾, 40.5 g 1-Hydroxy-benzotriazol, 19.2 ccm *N*-Äthyl-morpholin und bei 0° eine kalte Lösung von 31 g Dicyclohexylcarbodiimid in 150 ccm Dimethylformamid. Man läßt 1 Stde. bei 0° und über Nacht bei Raumtemp. rühren. Der ausgefallene Niederschlag wird anderntags abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in 1.5 l Essigester, dem wenig Wasser und Äthanol zugesetzt wurde, gelöst und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird die Essigesterlösung i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Rohausb. 97.2 g (88%). Das Rohprodukt wurde zweimal mit Essigester ausgeköcht. Ausb. 73 g (66%). $[\alpha]_D^{25}$: -25.8° ($c = 1$, 90proz. Essigsäure), $[\alpha]_D^{25}$: -13.5° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

C₃₉H₄₅N₇O₈ (739.8) Ber. C 63.32 H 6.13 N 13.25

C₃₉H₄₅N₇O₈ · 1/2 H₂O (748.8) Ber. C 62.55 H 6.19 N 13.10
Gef. C 62.2 H 6.4 N 12.6

d) *pGlu-His-Pro-NH₂* („TRH“) (1a): 74 g (0.1 Mol) 5 werden 1.5 Stdn. in 400 ccm Trifluoressigsäure/Anisol (9:1) unter Rückfluß gekocht. Man destilliert die Trifluoressigsäure

²⁵⁾ E. Fischer und L. H. Cone, Liebigs Ann. Chem. **363**, 107 (1908).

²⁶⁾ R. W. Chambers und F. H. Carpenter, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1522 (1955).

i. Vak. ab, destilliert zweimal i. Vak. mit Äther nach, extrahiert die Lösung des Rückstandes in 100 ccm Wasser dreimal mit Äther, gibt die wäbr. Lösung über einen stark basischen Austauscher in der OH-Form (z. B. „Serdolit Blau“), wäscht mit Wasser nach, dampft das Filtrat auf ein kleines Vol. (ca. 100 ccm) ein, entfärbt mit etwas Kohle und gefriertrocknet das Filtrat. Ausb. 29 g (80%) einer farblosen Substanz. $[\alpha]_D^{20}$: -63° ($c = 1$, Wasser).

$C_{16}H_{22}N_6O_4 \cdot 1 H_2O$ (380.4) Ber. C 50.5 H 6.35 N 22.1 Gef. C 50.0 H 6.0 N 21.8

Aminosäureanalyse: Glu 1.02, Pro 0.97, His 1.00, NH_3 1.04.

Beispiel 2: Synthese von „TRH“ (nach Syntheschema 2)

a) *Z-Pro-NH-Mbh*: Zu einer Lösung von 25 g (0.1 Mol) *Z-Pro-NH₂*²⁷⁾ und 24 g (0.1 Mol) 4,4'-Dimethoxy-benzhydrol in 200 ccm Eisessig gibt man 1 ccm konz. Schwefelsäure und läßt 2 Tage bei Raumtemp. stehen. Mit 800 ccm Wasser wird ein Öl ausgefällt, das bald kristallisiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wird mit $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Ausb. 38.1 g (80%). Schmp. 123–126°.

Dünnschichtchromatographisch konnte noch wenig *Z-Pro-NH₂* nachgewiesen werden. Zur Reinigung wird aus Äthanol/Wasser gefällt. Ausb. 36.65 g (77%). Schmp. 119–122°, $[\alpha]_D^{20}$: -5.1° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{28}H_{30}N_2O_5$ (474.6) Ber. C 70.88 H 6.34 N 5.92 Gef. C 70.8 H 6.1 N 5.9

b) *H-Pro-NH-Mbh* (6): Durch die Lösung von 29.2 g (61.6 mMol) *Z-Pro-NH-Mbh* in 200 ccm Methanol, der man etwas $Pd(OH)_2/BaSO_4$ -Katalysator zugesetzt hat, leitet man Wasserstoff, wobei durch Zutropfen von 1 *n* methanol. HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.5 gehalten wird. Nach der Hydrierung wird über ein Kieselgelfilter abgesaugt, das Filtrat eingengt und der Rückstand zwischen 60 ccm 2 *n* Na_2CO_3 und 150 ccm Essigester verteilt. Die Essigesterlösung wird über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand kristallisiert beim Verreiben mit Petroläther. Ausb. 18.8 g (90%). Schmp. 93–98°, $[\alpha]_D^{20}$: -30.7° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{20}H_{24}N_2O_3$ (340.4) Ber. C 70.57 H 7.10 N 8.23 Gef. C 70.0 H 7.0 N 8.6

c) *Z-Gln(Mbh)-His-Pro-NH-Mbh* (7a): Zu einer Lösung von 3.4 g (10 mMol) *H-Pro-NH-Mbh* (6) und 2.7 g (20 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol in 40 ccm Dimethylformamid gibt man 6.45 g (10 mMol) 4 und bei 0° eine kalte Lösung von 2.2 g Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid. Man läßt 1 Stde. bei 0° rühren. Es bildet sich dabei ein feiner gallertiger Niederschlag, der sich auf erneute Zugabe von ca. 20 ccm Dimethylformamid bei Raumtemp. innerhalb einer Stde. wieder löst. Vom Unlöslichen wird filtriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, und die Essigesterlösung zweimal mit 2 *n* Na_2CO_3 und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, mit $NaSO_4$ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben. Es entstehen 9 g einer amorphen Substanz (94.5%), die in Tetrahydrofuran über basisches Al_2O_3 (Woelm, Akt.-St. I) chromatographiert wird. Ausb. 7.4 g (78%). $[\alpha]_D^{20}$: -22.0° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{53}H_{57}N_7O_{10} \cdot 1 H_2O$ (970.1) Ber. C 65.60 H 6.13 N 10.12 Gef. C 66.1 H 6.3 N 10.0

d) *pGlu-His-Pro-NH₂* („TRH“) (1b): 2.04 g (2.1 Mol) 7a werden in 11 ccm Trifluoressigsäure/Anisol (10 : 1) 1.5 Stdn. unter Rückfluß gekocht und wie bei Beispiel 1d) aufgearbeitet. Ausb. 683 mg (88%), $[\alpha]_D^{20}$: -58.5° ($c = 1$, Wasser). Die Substanz ist dünnschichtchromatographisch identisch mit der nach Beispiel 1d) hergestellten.

²⁷⁾ D. Hamer und J. P. Greenstein, J. biol. Chemistry **193**, 81 (1951).

Beispiel 3: Synthese von „TRH“ (nach Syntheschema 3)

a) *Z-His-Pro-NH-Mbh*·H₂O (**8**): Zu einer auf -5° abgekühlten Lösung von 13.6 g (45 mMol) *Z-His-NHNH₂*²⁸⁾ in 110 ccm 1 *n* HCl gibt man 75 ccm Essigester und läßt unter Rühren eine eiskalte Lösung von 3.15 g NaNO₂ in wenig Wasser zutropfen. Nach 5 Min. gibt man eine auf 0° abgekühlte gesättigte Na₂CO₃-Lösung zu, bis die Reaktionsmischung alkalisch reagiert. In einem vorgekühlten Scheidetrichter wird die Essigesterphase abgetrennt und die wäbr. Phase noch einmal mit kaltem Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden bei -5° über Natriumsulfat getrocknet und bei 0° mit 6.8 g (20 mMol) **6** versetzt. Man läßt über Nacht im Eisschrank stehen und fällt anderntags mit Petroläther. Das Lösungsmittelgemisch wird von der schmierig ausfallenden Substanz dekantiert. Mit Äther wird zu einer amorphen Substanz verrieben, die in Tetrahydrofuran über etwa 40 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-St. I) chromatographiert wird. Ausb. 10.5 g (86%). $[\alpha]_D^{25}$: -31.6° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

C₃₄H₃₇N₅O₆·H₂O (629.7) Ber. C 64.88 H 6.25 N 11.12 Gef. C 65.0 H 6.3 N 11.2

b) *Z-Gln(Mbh)-His-Pro-NH-Mbh* (**7b**): Durch die Lösung von 6.30 g (10 mMol) **8** in 100 ccm Methanol, der man etwas Pd(OH)₂/BaSO₄-Katalysator zugesetzt hat, leitet man Wasserstoff, wobei durch Zutropfen von 1 *n* methanol. HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.5 gehalten wird. Nach beendeter Hydrierung waren 12.7 ccm 1 *n* methanol. HCl aufgenommen worden. Der Katalysator wird abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird in 20 ccm Dimethylformamid gelöst. Dazu gibt man 1.63 ccm *N*-Äthyl-morpholin (1.27 mMol), 2.7 g (20 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol und 5.05 g (10 mMol) *Z-Gln(Mbh)-OH*. Man kühlt auf 0° und gibt dann eine Lösung von 2.1 g Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ccm Dimethylformamid zu, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, saugt den gebildeten Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird zwischen Essigester und 2 *n* Na₂CO₃ verteilt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Es entstehen 8.25 g (87%) amorphe Substanz, die in Tetrahydrofuran über etwa 25 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-St. I) chromatographiert wird. Ausb. 6.35 g (67%). $[\alpha]_D^{25}$: -21.4° ($c = 1$, Dimethylacetamid). Die Substanz ist dünnschichtchromatographisch mit der nach Beispiel 2c) hergestellten identisch.

c) *pGlu-His-Pro-NH₂* („TRH“) (**1c**): Bei der Behandlung von **7b** mit Trifluoressigsäure/Anisol entsteht analog Beispiel 2d) „TRH“.

Beispiel 4: Synthese von „TRH“ (nach Syntheschema 4)

a) *Z-Gln-His-Pro-NH-Mbh* (**10**): Durch die Lösung von 6.30 g (10 mMol) **8** in 100 ccm Methanol, der man etwas Pd(OH)₂/BaSO₄-Katalysator zugesetzt hat, leitet man Wasserstoff, wobei durch Zutropfen von 0.93 *n* methanol. HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.0 gehalten wird. Nach beendeter Hydrierung waren 17 ccm 0.93 *n* methanol. HCl aufgenommen worden. Der Katalysator wird abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird in 30 ccm Dimethylformamid gelöst. Dazu gibt man 2.04 ccm (15.8 mMol) *N*-Äthyl-morpholin, 2.7 g (20 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol und 2.8 g (10 mMol) *Z-Gln-OH*. Man kühlt auf 0° und gibt dann eine Lösung von 2.1 g Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ccm Dimethylformamid zu, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, saugt den gebildeten Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird zwischen Essigester, dem etwas Dimethylformamid zugesetzt wird, und 2 *n* Na₂CO₃ verteilt. Die Essigesterphase wird dann noch mit NaCl-Lösung ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand

²⁸⁾ R. W. Holley und E. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. 76, 1326 (1954).

wird mit Äther verrieben und aus Tetrahydrofuran/Äther umgefällt. Ausb. 4.15 g (56%). $[\alpha]_D^{25}$: -33.5° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{39}H_{45}N_7O_8 \cdot 0.5H_2O$ (748.8) Ber. C 62.52 H 6.19 N 13.1 Gef. C 62.6 H 6.2 N 12.9

b) *pGlu-His-Pro-NH₂* („TRH“) (1d): 1 g (1.34 mMol) **10** werden 1.5–2 Stdn. in 5.5 ccm Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird wie bei Beispiel 1d) aufgearbeitet. Ausb. 366 mg (72%). Dünnschichtchromatographisch identisch mit „TRH“ nach Beispiel 1a).

Beispiel 5: Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidin-pyrrolidid (12)

a) *Z-Gln(Mbh)-His-pyrrolidid* (11): Zu einer Lösung von 3.22 g (5 mMol) **4** in 30 ccm Dimethylformamid gibt man 1.35 g (10 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol, 0.45 ccm Pyrrolidin und bei 0° 1.1 g Dicyclohexylcarbodiimid. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit 50 ccm 2*n* Na₂CO₃ verrieben, abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 3.7 g. Aus Essigester wird umkristallisiert, wobei Unlösliches abfiltriert wurde. Ausb. 2.5 g, Schmp. 118–123°, $[\alpha]_D^{25}$: $+7.2^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid). Aus der Mutterlauge konnten noch einmal 770 mg gewonnen werden. Gesamtausb. 3.27 g (94%).

$C_{38}H_{44}N_6O_7$ (696.8) Ber. C 65.49 H 6.36 N 12.08 Gef. C 65.8 H 6.7 N 11.9

b) *pGlu-His-pyrrolidid* (12): 1.0 g **11** wird 2 Stdn. in 5.5 ccm Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) unter Rückfluß gekocht. Man destilliert die Trifluoressigsäure i. Vak. ab, destilliert zweimal mit Äther nach, verteilt den Rückstand zwischen Wasser und Äther und gibt die wäbr. Lösung über einen stark basischen Austauscher in der OH-Form (z. B. „Serdolit Blau“). Das Eluat wird gefriergetrocknet. Ausb. 334.2 mg (67%). $[\alpha]_D^{25}$: $+14.1^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{15}H_{21}N_5O_3 \cdot 1.5H_2O$ (346.3) Ber. C 52.45 H 6.98 N 20.32 Gef. C 52.5 H 6.7 N 19.7

Beispiel 6: Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidin (13)

36 g **4** (56 mMol) werden in 120 ccm Trifluoressigsäure und 12 ccm Anisol 90 Min. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird die Trifluoressigsäure abdestilliert und der Rückstand zwischen Äther und Wasser verteilt. Die wäbr. Phase wird 2 mal mit Äther extrahiert und mit Amberlite IR 45 (Acetat-Form) verrührt, bis der pH-Wert der Lösung etwa 3.5 erreicht hat. Die wäbr. Lösung wird gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in wenig Methanol gelöst. Diese methanol. Lösung läßt man unter Rühren in etwa 200 ccm Äther eintropfen. Das entstehende amorphe Produkt wird abgesaugt und über P₂O₅ getrocknet (hygroskopisch!). Ausb. 14.2 g (84%). $[\alpha]_D^{30}$: -3.9° ($c = 1$, Wasser).

$C_{11}H_{14}N_4O_4 \cdot 2H_2O$ (302.3) Ber. C 43.70 H 6.00 N 18.53 Gef. C 44.7 H 5.8 N 18.5

Beispiel 7: Synthese von L-Pyroglutamyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-asparaginyll-L-tyrosin (22) (nach Syntheschema 5)

a) *H-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH* (15): 87.5 g (0.123 Mol) *Z-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH* (14)¹⁹⁾ werden in Eisessig mittels Wasserstoff und Pd/BaSO₄-Katalysator hydriert. Nachdem die CO₂-Entwicklung beendet ist, wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird mit gesättigter Natriumacetatlösung 3 Stdn. gerührt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen, über P₂O₅ getrocknet und aus Tetrahydrofuran/Petroläther umgefällt. Ausb. 63.45 g (89.5%), Zers. bei 207–209°, $[\alpha]_D^{25}$: $+11.1^\circ$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_{32}H_{39}N_3O_7$ (577.7) Ber. C 66.55 H 6.75 N 7.34 Gef. C 66.2 H 6.7 N 7.0

b) *Z-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH* (16): Zu einer Lösung von 63 g (0.109 Mol) **15** in 250 ccm Dimethylformamid gibt man bei Raumtemp. 47.4 g (0.109 Mol) *Z-Glu(OBu^t)-*

OSu²⁹) und läßt etwa 20 Stdn. bei Raumtemp. stehen. Die Reaktionslösung wird dann mit reichlich Wasser versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausb. 75.5 g (77%). Schmp. 166–170°, $[\alpha]_D^{25}$: +1.8° ($c = 1$, Dimethylformamid).

C₄₉H₆₀N₄O₁₂ (897.0) Ber. C 65.60 H 6.74 N 6.26

Gef. C 63.2 H 6.6 N 6.5

C₄₉H₆₀N₄O₁₂·2H₂O (933.0) Ber. C 63.1 H 6.91 N 6.0

c) *H-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH (17)*: 74.7 g (83.3 mMol) **16** werden in einer Mischung aus 400 ccm Eisessig und 400 ccm Methanol wie bei Beispiel 7a) katalytisch hydriert. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Nun wird mit gesättigter Natriumacetatlösung verrieben, abgesaugt und mit Wasser auf dem Dampfbad kurz erhitzt. Man läßt auf Raumtemp. abkühlen, saugt ab, wäscht mit Wasser und trocknet über P₂O₅. Ausb. 53.4 g (84%). Schmp. 219–220° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: +33.1° ($c = 1$, Eisessig).

C₄₁H₅₄N₄O₁₀ (762.9) Ber. C 64.55 H 7.14 N 7.35 Gef. C 63.9 H 7.4 N 7.4

d) *Z-Leu-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH (18)*: Zu einer Lösung von 19 g **17** (25 mMol) in 100 ccm Dimethylacetamid gibt man 9.1 g *Z-Leu-OSu*³⁰) (25 mMol). Nach einem Tag bei Raumtemp. wird mit Wasser das Peptid gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in Essigester gelöst. Sich abscheidendes Wasser wird abgetrennt. Die Essigesterlösung wird über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausb. 23.7 g (84.5%). $[\alpha]_D^{25}$: +3.7° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

C₅₅H₇₁N₅O₁₃ (1010.2) Ber. C 65.38 H 7.08 N 6.93 Gef. C 64.2 H 6.9 N 7.3

e) *H-Leu-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH (19)*: 28.5 g (28.2 mMol) **18** werden in Eisessig wie bei Beispiel 7a) katalytisch hydriert. Der Rückstand wird mit gesättigter Natriumacetatlösung verrieben, abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Ausb. 22.5 g (91%). Schmp. 206–207°, $[\alpha]_D^{25}$: –3.9° ($c = 1$, Dimethylformamid).

C₄₇H₆₅N₅O₁₁·1H₂O (876.1) Ber. C 63.15 H 7.55 N 7.84 Gef. C 63.2 H 7.6 N 7.8

f) *Z-Gln(Mbh)-OSu (20)*: Zu einer Lösung von 50.7 g (0.1 Mol) *Z-Gln(Mbh)-OH*¹⁹) und 11.5 g (0.1 Mol) *N-Hydroxy-succinimid* in 300 ccm absol. Tetrahydrofuran gibt man bei 0° 21 g Dicyclohexylcarbodiimid und läßt 2 Stdn. bei 0° rühren. Über Nacht wird in den Eischrank gestellt. Es fällt ein dicker Niederschlag aus, der abgesaugt wird. Der Niederschlag wird mit Dimethylformamid verrührt, von Unlöslichem wird abgesaugt und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird mit Isopropylalkohol aufgeköcht, abgesaugt und mit Äther gewaschen. Ausb. 41.2 g. Schmp. 197–198°, $[\alpha]_D^{25}$: –16.3° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

Die Tetrahydrofuranmutterlauge wird ebenfalls eingengt und der resultierende Rückstand mit Isopropylalkohol aufgeköcht. Ausb. 9.8 g. Schmp. 190–191°, $[\alpha]_D^{25}$: –15.65° ($c = 1$, Dimethylacetamid). Gesamtausb. 51.0 g (84%).

C₃₂H₃₃N₃O₉ (603.6) Ber. C 63.69 H 5.51 N 6.97 Gef. C 64.1 H 5.6 N 7.2

g) *Z-Gln(Mbh)-Leu-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH (21)*: Zu einer Lösung von 12.9 g (14.75 mMol) **19** in 60 ccm Dimethylacetamid gibt man 8.9 g (14.75 mMol) **20** und 1.9 ccm *N*-Äthyl-morpholin und rührt 3 Tage bei Raumtemp. Mit 20 ccm 2*n* Citronensäure und viel

²⁹ R. Zabel und H. Zahn, Z. Naturforsch. **20b**, 650 (1965).

³⁰ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3039 (1963); **86**, 1839 (1964).

Wasser wird das Peptid gefällt. Anschließend wird abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und getrocknet. Mit Methanol wird kurz aufgekocht, gekühlt und abgesaugt. Ausb. 18.1 g (90%). Schmp. 230–234°, $[\alpha]_D^{25}$: -0.3° ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{75}H_{93}N_7O_{17}$ (1364.6) Ber. C 66.0 H 6.87 N 7.19 Gef. C 65.3 H 7.1 N 8.0

h) *pGlu-Leu-Glu-Asn-Tyr-OH* (**22**): 580 mg (0.425 mMol) **21** werden in Eisessig wie bei Beispiel 7a) katalytisch hydriert. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Ausb. 500 mg. Schmp. 174–178°.

Die so gewonnenen 500 mg H-Gln(Mbh)-Leu-Glu(OBu^t)-Asn(Mbh)-Tyr(Bu^t)-OH-acetat werden in 5.5 ccm Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) 30 Min. unter Rückfluß gekocht. Dann wird i. Vak. eingeengt und der Rückstand zwischen Wasser und Äther verteilt. Die wäBr. Phase wird gefriergetrocknet. Ausb. 254.5 mg. DC: R_F 0.6 in Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak (60:45:20), ninhydrinnegativ!

Aminosäureanalyse: Tyr 0.93, Leu 1.00, Glu 1.89, Asp 1.05.

[144/72]